

# INFLUENCE DU CYCLE NYCTHEMERAL SUR LE STATUT IMMUNITAIRE A MEDIATION CELLULAIRE DU CHIEN BEAGLE DE LABORATOIRE

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2001  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Philippe CARLIER**  
Né, le 12 juin 1968 à LILLE (Nord)

---

Directeur de thèse : **M. le Professeur BODIN**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. DABERNAT**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEUR :  
M. BODIN  
**M. EECKHOUTTE**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur .....	: M.	<b>P. BENARD</b>
Directeurs honoraires.....	: MM.	<b>R. FLORIO</b>
		<b>R. LAUTIE</b>
		<b>J. FERNEY</b>
		<b>G. VAN HAVERBEKE</b>
Professeurs honoraires.....	: MM.	<b>A. BRIZARD</b>
		<b>L. FALIU</b>
		<b>C. LABIE</b>
		<b>C. PAVAUX</b>
		<b>F. LESCURE</b>
		<b>A. RICO</b>

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

Mme **BURGAT-SACAZE Viviane**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **CAZIEUX André, (sur nombre)** *Pathologie chirurgicale*  
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*

**PROFESSEURS 1<sup>ère</sup> CLASSE**

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*  
M. **BENARD Patrick**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*  
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*  
M. **DARRE Roland**, *Productions animales*  
M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*  
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. **GRIESS Daniel**, *Alimentation*  
M. **GUELFI Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*  
M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*  
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*  
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*  
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2<sup>e</sup> CLASSE**

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*  
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*  
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*  
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*  
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*  
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

## PROFESSEUR CERTIFIE DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*

M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

## MAITRES DE CONFERENCES 1<sup>ère</sup> CLASSE

M. **ASIMUS Erick**, *Pathologie chirurgicale*

Mme **BENNIS- BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*

M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*

Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*

Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*

M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*

M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*

M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*

Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*

M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*

M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*

M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*

M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*

M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*

Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*

Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

M. **SANS Pierre**, *Productions animales*

## MAITRES DE CONFERENCES 2<sup>e</sup> CLASSE

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*

Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*

Mlle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*

M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*

Mlle **GAYRARD Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*

Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*

Mlle **HAY Magali**, *Zootecnie*

M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*

M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*

M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*

Mlle **RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*

Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

## ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*

M. **MARENDA Marc**, *Pathologie de la Reproduction*

Mlle **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*

Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*

M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

**AU PRESIDENT DE THESE**

A Monsieur le Professeur Dabernat  
Professeur des Universités Paul Sabatier de TOULOUSE  
Praticien Hospitalier  
Bactériologie-Virologie

Pour avoir accepté la présidence du jury.

Sincères remerciements



## **A NOTRE JURY DE THESE**

A Monsieur le Professeur Bodin  
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Pathologie générale, microbiologie, immunologie

Pour cette étude, sa confiance, sa disponibilité et  
son soutien en toutes circonstances.

Sincères remerciements

A Monsieur le Professeur Eeckhoutte  
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale

Pour avoir participé au jury de thèse

Sincères remerciements





A Monsieur TASCA Christian,  
Responsable de l'animalerie du département d'Immunologie-  
Microbiologie de l'ENVT au moment de la réalisation de ce travail.

Pour son aide indispensable et sa disponibilité.

Sincères remerciements

A l'ensemble du personnel du département d'Immunologie-  
Microbiologie de l'ENVT.

Pour son accueil et sa sympathie.

Sincères remerciements

A l'ensemble du personnel du département de Biochimie de l'ENVT.

Pour l'aide et le temps passé sur le compteur Béta.

Sincères remerciements



A ma famille

A mes parents, sur qui je peux toujours compter.

Encore une fois merci

A

**LEONORE et PIERRE**

pour toutes les joies qu'ils m'apportent.

**ENORMES BISOUS**



Aux nombreux amis qui se sont relayés pour les prélèvements, de jour comme de nuit et qui ont permis la réalisation de cette étude.

**UN GRAND MERCI**

A CARO et ALEX pour leur aide, leur soutien et surtout leur amitié.  
Ainsi qu'aux autres « TETES ».

A HERVE pour son soutien et son amitié.



# **TABLE DES MATIERES**

<b><u>Introduction</u></b> .....	1
<b><u>1 Généralités sur l'immunité</u></b> .....	2
<b>1.1 Immunité non spécifique</b> .....	2
1.1.1 Processus mécaniques.....	2
1.1.2 Processus chimiques.....	2
1.1.3 Processus cellulaires.....	2
1.1.4 Processus humoraux.....	2
1.1.5 Processus métaboliques.....	3
<b>1.2 Immunité spécifique</b> .....	3
1.2.1 Les lymphocytes B.....	3
a) Maturation	
b) Fonctions	
1.2.2 Les lymphocytes T.....	4
a) Maturation	
b) Sous-populations et fonctions	
1.2.3 Les cytokines.....	5
<b>1.3 Interactions neuro-endocrino-immunitaires</b> .....	6
1.3.1 Innervation neuro-végétative des organes lymphoïdes.....	6
1.3.2 Influences hormonales et neuro-endocriniennes.....	6
<b>1.4 Exploration de l'immunité à médiation cellulaire</b> .....	7
1.4.1 Réfringence nucléaire des lymphocytes.....	7
1.4.2 Réponse lymphocytaire aux allo-antigènes.....	7
1.4.3 Réponse lymphocytaire aux mitogènes.....	8
<b><u>2 Les rythmes biologiques</u></b> .....	8
<b>2.1 Définition des différents rythmes biologiques</b> .....	8
2.1.1 Rythmes circannuels.....	8
2.1.2 Rythmes ultradiens.....	9
2.1.3 Rythmes circadiens.....	9

<b>2.2 Les rythmes circadiens.....</b>	<b>9</b>
2.2.1 Endogénie des cycles circadiens.....	9
2.2.2 Principal « pacemaker » et transcription des données pour l'organisme.....	10
<b><u>3 Etude expérimentale.....</u></b>	<b>11</b>
<b>3.1 Mise en œuvre de l'expérience.....</b>	<b>11</b>
3.1.1 La population étudiée.....	11
3.1.2 Planning des prélèvements.....	11
<b>3.2 Réalisation du test de transformation lymphoblastique.....</b>	<b>12</b>
3.2.1 Séparation des lymphocytes.....	12
3.2.2 Ajustement de la concentration cellulaire.....	12
3.2.3 Mise en culture des lymphocytes.....	13
3.2.4 Filtrage et comptage.....	13
<b>3.3 Résultats.....</b>	<b>14</b>
3.3.1 Données et étude graphique.....	14
3.3.2 Analyse statistique.....	14
<b><u>4 Discussion.....</u></b>	<b>15</b>
<b>4.1 Choix de la population.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2 Variations des réponses interindividuelles et intraindividuelles.....</b>	<b>15</b>
<b>4.3 Choix de la méthode d'exploration.....</b>	<b>15</b>
<b>4.4 Choix du planning de prélèvements.....</b>	<b>16</b>
<b>4.5 Objectifs et résultats de l'expérimentation.....</b>	<b>16</b>
<b><u>Conclusion.....</u></b>	<b>17</b>
<b><u>Annexe.....</u></b>	<b>18</b>
<b><u>Bibliographie .....</u></b>	<b>26</b>



**Ce travail a été réalisé à la faveur d'une convention passée  
entre le département d'Immunologie-Microbiologie de l'ENVT et  
la firme ROYAL CANIN.**

**Sincères remerciements**



**INFLUENCE DU CYCLE  
NYCTHEMERAL SUR  
LE STATUT IMMUNITAIRE  
A MEDIATION CELLULAIRE  
DU CHIEN BEAGLE  
DE LABORATOIRE**



## **INTRODUCTION**

L'importance croissante des examens complémentaires et les études de l'influence de tel ou tel facteur sur l'organisme de l'animal, montrent la nécessité d'avoir un étalonnage de référence fiable, exempt de biais ou qui limite l'influence de ces derniers. Ainsi, lors de prélèvements, il faut prendre en compte le facteur « heure de la journée ». En effet, de nombreuses fonctions de l'organisme possèdent un rythme circadien. On le trouve par exemple chez le chien, au niveau de la concentration sanguine en glucocorticoïdes. Chez le mouton, le statut immunitaire à médiation cellulaire a également montré une variation lors du cycle nycthéméral ( Art. de Rai El Balhaa et al [ 54]).

Cette étude a pour objectif d'analyser les données concernant le chien, en utilisant comme sujet de référence le Beagle de laboratoire, et d'établir une courbe étalon sur l'immunité cellulaire au cours du nycthémère. La première étape est de vérifier l'existence d'un cycle et d'en définir le type. Le test de transformation lymphoblastique se révèle être la méthode la plus appropriée pour l'exploration de cette fonction. L'analyse statistique a permis de mettre en évidence des pics réactionnels, démontrant ainsi l'importance de l'heure de prélèvement et la nécessité d'effectuer ces derniers à heure fixe afin d'éviter un biais et d'optimiser la répétitivité des analyses réalisées.

# **1 GENERALITES SUR L'IMMUNITE**

## **1.1 Immunité non spécifique** [ 5, 16, 49, 50, 51, 56]

L'organisme dispose de défenses rapides et à facettes multiples pour lutter contre les agressions extérieures.

### **1.1.1 Processus mécaniques**

Les défenses mécaniques repoussent ou limitent la portée des agents externes, comme l'escalator respiratoire ou le péristaltisme intestinal. Elles représentent les premières barrières de l'organisme dans la protection du milieu intérieur.

### **1.1.2 Processus chimiques**

Les défenses chimiques par acidification ou alcalinisation d'un milieu ( liquide stomacal, urine ou peau... ) lysent ou inhibent les bactéries. Elles rendent le milieu de contact impropre à la prolifération de certains agents extérieurs.

### **1.1.3 Processus cellulaires**

Les processus cellulaires sont les défenses de type phagocytose, jouant également un rôle dans l'immunité spécifique par digestion de la particule et « l'analyse » de ces composants. Il existe parmi les phagocytes, les granulocytes neutrophiles et les macrophages. Ils assurent l'ingestion et la destruction de particules vivantes ou inertes. Après activation lors de la phagocytose, ils libèrent des facteurs solubles influant sur les lymphocytes ( interleukines dont IL1, facteur d'activation plaquettaire, facteur nécrosant des tumeurs ou TNF, fibronectine...) et jouent un rôle important sur les cellules présentatrices d'antigènes.

On note également la présence de cellules dites « Natural Killer », dans les effecteurs non spécifiques, dont la fonction est de tuer les cellules tumorales ou celles infectées par un virus.

### **1.1.4 Processus humoraux**

Il existe divers facteurs dans cette défense non spécifique: les anticorps naturels (agglutinines naturelles), le système complément-properdine ( activation du complément par voie alterne ), les bactériocines présentes dans le sérum, les interférons produits par les cellules infectées(interférons alpha des leucocytes ou des fibroblastes ...) et la protéine C-réactive issue rapidement des hépatocytes lors d'infection ( elle est en dehors de la sphère immunitaire mais son rôle est analogue ).

### 1.1.5 Processus métabolique

Il s'agit de réactions le plus souvent en cascade, comme l'apparition de la fièvre, conduisant à l'obtention d'un environnement défavorable à la prolifération infectieuse. L'IL1 et le TNF tiennent une place prépondérante dans ce processus.

Lorsque la réaction immunitaire non spécifique est insuffisante, une seconde barrière entre en jeu, plus puissante et plus focalisée : la réaction immunitaire spécifique.

## 1.2 Immunité spécifique [ 16, 26, 49, 50, 51, 56, 71]

Il s'agit des cellules de la lignée lymphoïde comprenant les plasmocytes ( appartenant aux lymphocytes B et produisant les anticorps ) et les lymphocytes T, ces derniers représentant l'immunité à médiation cellulaire. Les LT et LB sont issus de la même souche lymphoïde, mais leur différenciation s'opère dans deux organes distincts : le thymus pour les LT et la moelle osseuse pour les LB. Ils y acquièrent également l'apprentissage du Soi et du Non-Soi, ainsi qu'un répertoire de reconnaissance antigénique du milieu extérieur.

### 1.2.1 Les lymphocytes B [ 4,5]

Ils tirent leur nom de la découverte du rôle de la Bourse de Fabricius chez les oiseaux, organe lymphoïde central à l'origine de la sécrétion des anticorps.

#### a) Maturation

Leur différenciation s'effectue dans la moelle. Ils sont stimulés par le contact antigène-immunoglobuline membranaire et lorsque l'antigène est T-dépendant avec l'intervention des LT auxiliaires sécrétant l'IL2 (eux mêmes stimulés par cet antigène). Une fois activés en lymphoblastes, ils se multiplient et se différencient en plasmocytes sécrétant les anticorps spécifiques de l'Ag. Une partie des informations sera stockée par les LB-mémoire, issus pense-t-on des lymphoblastes non différenciés, afin d'augmenter la précocité de la réponse lors de la présentation de ce même Ag. Leur principale migration les dirige vers les territoires lymphoïdes périphériques, plus précisément dans les zones thymo-indépendantes. Ils sont plus sédentaires que les LT et ne recirculent que faiblement, sauf lors d'intense stimulation antigénique. C'est pour cela que l'étude de la population lymphocytaire circulante est tournée vers les lymphocytes T.

Les LB sont, de façon globale, responsables des réponses immunitaires à médiation humorale.

## b) Fonctions

Après contact antigénique, les LB se transforment et évoluent progressivement en plasmocytes. Ces derniers produisent les immunoglobulines (Ig) à destination du sang et des sécrétions. Il existe plusieurs classes d'Ig, avec un point commun fondamental, la spécificité à un antigène. Elles possèdent des particularités de localisation (IgA passant dans les sécrétions, IgG et IgM dans le sérum principalement) ou de fonction (IgE et hypersensibilité de type I). Cette production est régulée par les LT Helper (activation) et les LT Suppresseur (inhibition).

Le rôle des anticorps n'est pas cantonné à la défense contre les antigènes extérieurs. Les Ig agissent seules ou en présence de complément, dans le phénomène d'opsonisation (facilite la phagocytose) ou de neutralisation (des toxines) d'un point de vue immunité anti-bactérienne. Elles agissent de la même façon sur les entités virales durant les stades de virémie. Enfin, de concert avec les Natural Killer (NK) ou le complément, elles entrent en action contre les cellules tumorales ou les greffons. A côté de ces rôles de protection, les Ig sont à l'origine d'autres conséquences sur l'organisme. Elles sont responsables des réactions d'hypersensibilité

- Type I : anaphylaxie, allergie
- Type II : allo-immunisation post-transfusionnelle
- Type III : maladies par dépôt d'immuno-complexes.

Elles sont aussi en cause dans les maladies auto-immunes, même si le déficit primaire se situe au niveau des LT, notamment Suppresseur, qui ne régulent plus leur production.

### 1.2.2 Les lymphocytes T [ 4, 5, 12, 17]

Leur rôle essentiel est représenté par les réponses immunitaires à médiation cellulaire. Ce sont ces cellules qui ont été testées dans cette étude, car présentes de manière importante dans la circulation.

## a) Maturation

Après différenciation dans le thymus (région médullaire), sans contact antigénique, ils gagnent la circulation générale pour rejoindre les zones thymo-dépendantes des organes lymphoïdes secondaires ( nœuds lymphatiques, rate, tissus lymphoïdes .... ). Sous l'influence de stimuli antigéniques, ils vont acquérir de nouvelles propriétés correspondant à diverses sous-populations. Après cette première migration dans les territoires lymphoïdes périphériques, une majorité effectue un phénomène de recirculation dans la lymphe et le sang, avec un pool important de LT mémoire ayant une longue durée de vie, surveillant ainsi l'organisme.

## b) Fonctions générales et sous-populations

Lors de l'introduction d'un antigène dans l'organisme, il est phagocyté puis fragmenté par les macrophages, qui ensuite vont le présenter à leur surface (associé aux antigènes d'histo-compatibilité de classe II), afin d'activer les LT. La présentation de cet antigène couplée avec la sécrétion d'IL1 stimule la sous-population des LT Helper, qui à leur tour



vont activer les LT effecteur et les LB (nécessitant l'antigène spécifique et la sécrétion d'IL2). Si l'antigène est présent en quantité trop faible ou trop forte, le macrophage ne produit pas d'IL1. Ceux sont alors les LT suppresseur qui sont stimulés et qui inhibent l'action des LT effecteur et des LB, provoquant une situation de tolérance immunitaire. Les diverses sous-populations sont en interaction entre elles, ainsi qu'avec d'autres cellules de l'organisme. On distingue les catégories suivantes :

- ◆ Les lymphocytes cytotoxiques ou Killer (TK) lysant les cellules à Ag spécifiques : greffe, tumeur et immunité anti-virale.
- ◆ Les lymphocytes T suppresseur inhibant l'action des LB et LT auxiliaires. Important dans l'immunorégulation.
- ◆ Les lymphocytes T auxiliaires ou T Helper sécrétant des lymphokines intervenant dans le processus inflammatoire. Ils répondent aussi à un Ag spécifique.
- ◆ Les lymphocytes sécréteurs de lymphokines non spécifiques d'Ag ayant un rôle dans la coopération des cellules immunocompétentes ( LB, macrophages, granulocytes neutrophiles ...).
- ◆ Les lymphocytes T mémoire conservant l'information antigénique et assurant la réponse immunitaire secondaire.

La fonction de la réponse immunitaire de type cellulaire comprend plusieurs facettes :

- L'hypersensibilité retardée de type IV : action des LT sécréteurs de lymphokines ( intadermo-réaction).
- Action contre les greffons et tumeurs : intervention majeure des TK, des sécréteurs de lymphokines sur les macrophages, des T suppresseur régulant la réponse, et afin des T mémoire.
- Action anti-infectieuse : intervention des TK, NK et T sécréteurs sur les viroses, mycoses et infections bactériennes intracellulaires.

L'importance et la multiplicité de la fonction des LT en font le « chef d'orchestre » de la réponse immunitaire. Il est alors aisé de comprendre que tout trouble du fonctionnement de la population T entraîne une pathologie immunitaire majeure.

### 1.2.3 Les cytokines [ 4, 5, 8, 13, 17, 41]

Ces facteurs solubles, dont certains ont déjà été cités dans la présentation des LT et LB, assurent la coopération entre les divers intervenants de la réponse immunitaire. Les cytokines représentent la forme de communication cellulaire de tous les intervenants d'un point de vue déclenchement ainsi que sur l'intensité et la régulation de la réponse immunitaire. On y trouve notamment :

- L'IL1 des macrophages, les lymphokines ( cf : LT, LB).
- L'IL2 : sécrétée par les LT Helper, elle stimule la production d'Ig par les LB, la différenciation des TK et contrôle la sécrétion d'interféron gamma par les LT.
- L'interféron gamma : augmente l'activité des macrophages et amplifie l'expression des récepteurs à IL2 sur les LT.

De nombreux acteurs entrent en scène lors d'une agression extérieure, ces molécules solubles leur permettent de communiquer afin d'agir de façon cohérente et intense. Elles ne sont pas seules dans ce micro-environnement lymphocytaire, on y trouve également des substances hormonales ou neuro-endocriniennes.

### 1.3 Interactions neuro-endocrino-immunitaires

[ 14, 16, 17, 24, 25, 31, 32, 33, 42, 44, 45, 48, 49, 50, 51, 56, 61, 67, 68]

#### 1.3.1 Innervation neuro-végétative des organes lymphoïdes [10, 23, 69]

Des études anatomiques ont montré l'existence de fibres para- et orthosympathiques, innervant les organes lymphoïdes primaires et secondaires. Les filets nerveux se terminent soit au contact des cellules parenchymateuses, soit directement au contact des cellules lymphocytaires. Les fibres sympathiques noradrénergiques, présentes dans les zones T-dépendantes, aboutissent directement à un type particulier de cellules: les lymphocytes, les granulocytes éosinophiles, les macrophages ... L'innervation autonome agit vraisemblablement sur le contrôle du flux sanguin, la circulation des cellules lymphocytaires, la sécrétion de facteurs locaux, mais aussi sur la différenciation des lymphocytes. Ces nerfs créent un micro-environnement chimique par sécrétion, non seulement de catécholamines, mais aussi de divers peptides ( substance P, neurotensine ...) dont des récepteurs sont sur les membranes des thymocytes et des lymphocytes T activés.

#### 1.3.2 Influences hormonales et neuro-endocriniennes [ 1, 8, 10, 13, 19, 20, 29, 34 ]

Il est considéré que trois systèmes principaux peuvent influencer le système immunitaire :

- Le thymus

C'est l'organe lymphoïde central, responsable de la formation des LT, régulateur des réponses immunes et effecteur des réponses immunes cellulaires. La compétence des LT s'acquiert sous contrôle du système nerveux végétatif et du micro-environnement thymique ( sécrétion de facteurs solubles ).

- Le système nerveux central via l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien

L'ensemble du système immunitaire subit l'influence de cet axe par la libération de nombreuses hormones ( les effets du cortisol étant les plus connus ). Les glucocorticoïdes ont une action immunosuppressive, le CRF accroît la prolifération, l'ACTH est immunosuppresseur et les catécholamines sont globalement inhibitrices. D'autres hormones interviennent également : les gonadiques, les thyroïdiennes ( TSH, thyroxine ... ), l'hormone de croissance, la somatostatine, la prolactine et d'autres. Cette énumération montre l'importance de cet axe et la complexité des interactions pouvant intervenir sur le système immunitaire.

- Le système neuro-endocrinien diffus ( APUD )

Son rôle est plus localisé. Il intervient, au sein de tissus, dans la constitution du micro-environnement par la libération de neuropeptides ( substance P, ocytocine, vasopressine, neurotensine, facteurs de croissance tissulaire ... ).

De nombreux facteurs influent sur le statut immunitaire. Les variations de ce dernier peuvent être explorées de diverses manières, mais la particularité de cette étude tant d'un point de vue dynamique que d'un point de vue population étudiée, restreint les techniques pouvant être utilisées afin d'obtenir un résultat fiable.

## 1.4 Exploration de l'immunité à médiation cellulaire

[ 3, 8, 27, 39, 47, 49, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 66, 70]

Il existe des tests in vivo , comme les intradermoréactions ou le test de rejet de greffe, des tests in vitro comme l'analyse de sang ou celle des organes lymphoïdes. La particularité de cette étude sur le cycle nycthéral nécessite une répétition des prélèvements, afin d'obtenir une projection dans le temps de la fonction lymphocytaire. Il est donc impératif d'utiliser une méthode dont le caractère répétitif est le principal critère.

Plusieurs tests sont à disposition pour obtenir les données relatives à une exploration de l'immunité à médiation cellulaire ( cytotoxicité des cellules T, NK, TK, activité de la perforine ... ). Le plus judicieux est celui concernant l'activation et la prolifération des cellules de la lignée T par des antigènes, des cellules allogéniques ou des mitogènes.

En effet, il est préférable de choisir un test dynamique plutôt que statique dans cette étude. La transformation lymphoblastique peut être observée directement par microscope optique ( après coloration au May-Grünwald-Giemsa ) ou par le taux d'incorporation d'un précurseur radiomarké de l'ADN ( thymidine tritiée ).

### 1.4.1 Réfringence nucléaire des lymphocytes

La réfringence nucléaire des lymphocytes, provient d'une propriété de la chromatine acquise lors de la micro-incrustation de mercure après oxydation à chaud par le bichromate de potassium. Elle varie selon le niveau de condensation de la chromatine. L'index obtenu est élevé sur des lymphocytes matures ou différenciés, et faible sur ceux immatures.

On remarque une réponse précoce ( vingt à soixante minutes ) correspondant à l'activation nucléaire, et une réponse tardive ( vingt quatre à quarante huit heures ) correspondant à la phase proliférative. On peut donc ainsi apprécier le statut fonctionnel des lymphocytes.

### 1.4.2 Réponse lymphocytaire aux allo-antigènes [ 8]

Le principe est de mettre en coculture les lymphocytes avec des lymphocytes allogéniques histo-compatibles, afin de provoquer une transformation lymphoblastique. L'intensité de cette réaction, dite réaction lymphocytaire mixte (RLM), croît parallèlement avec la différence antigénique des deux populations. Les cellules stimulantes sont traitées ou irradiées, sans altérer leur viabilité, afin d'empêcher leur réaction.

Cette méthode est plus intéressante lors de l'étude des CMH, car l'existence d'une certaine hétérogénéité dans la population lymphocytaire peut entraîner une modification de la réponse lors de la RLM.

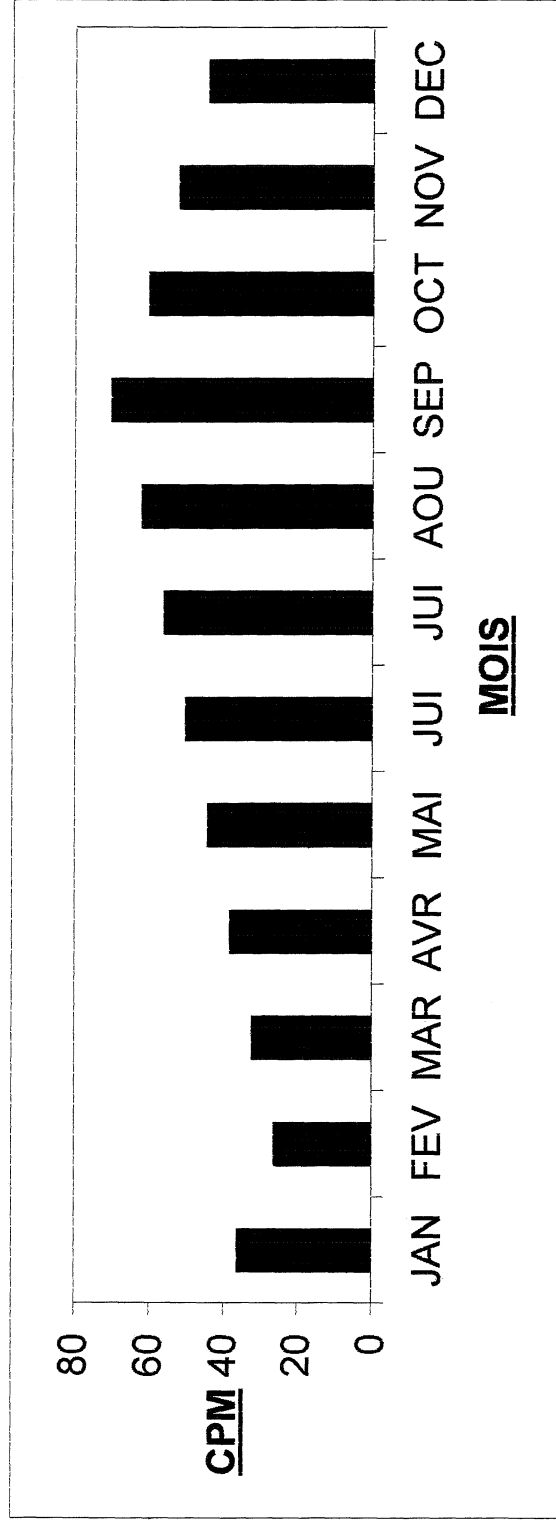


Fig 1 :  
VARIATIONS SAISONIERES  
DU STATUT IMMUNITAIRE  
A MEDIATION CELLULAIRE  
DU CHIEN

### 1.4.3 Réponse lymphocytaire aux mitogènes

[ 2, 7, 15, 18, 22, 30, 36, 37, 38, 43, 46, 57, 59, 62, 63, 64, 65]

Le test de transformation lymphoblastique ( TTL ) repose sur la stimulation des lymphocytes par certains mitogènes et l'incorporation de marqueur radioactif.

Il existe quatre principaux mitogènes :

- le lipopolysaccharide ( LPS ) qui s'avère cytotoxique chez le chien, mais utilisable chez d'autres espèces.
- le Poweked Mitogen ( PWM ) censé stimuler les LT mais donnant des résultats très inconstants.
- la phytohémagglutinine P ( PHA ) stimulant les LT et un peu les LB.
- la concanavaline A ( Con A ) qui est le mitogène le plus spécifique des LT du chien.

Ce sont les deux derniers qui sont les plus adaptés à la réalisation du TTL sur le chien.

La constance, la répétitivité et les manipulations nécessaires à la réalisation de ce test en ont fait l'outil le plus performant pour cette étude.

Le caractère multiple, des influences sur le système immunitaire , montre la complexité de sa régulation . Les variations interviennent vis à vis de stimuli environnementaux mais aussi de façon endogène et cyclique, indépendamment du milieu extérieur.

## **2 LES RYTHMES BIOLOGIQUES**

Cl . Bernard définit la vie comme un conflit entre l'organisme et son milieu. Afin d'éviter les contraintes du milieu extérieur, l'être vivant isole son milieu intérieur de ces stimuli néfastes grâce à de multiples régulations physiologiques ( pression osmotique, thermorégulation ... ). Les rythmes biologiques en font partie, permettant à l'organisme de s'adapter au mieux. Ils sont classés en trois catégories, selon la période qui les définit. Si une majorité de cycles sont communs entre individus, d'autres sont individuels et confèrent une structure temporelle propre à chaque organisme.

### 2.1 Définitions des différents rythmes biologiques [ 11, 21, 28, 44, 45, 60, 61]

#### 2.1.1 Rythmes circannuels

Les rythmes circannuels, qui tiennent un rôle prépondérant dans l'adaptation de l'organisme aux variations saisonnières, tirent leur période de synchroniseurs externes. Shifrine et al. [ 60] ont ainsi démontré une variation saisonnière du statut immunitaire à médiation cellulaire chez le chien, avec une réponse faible aux mitogènes durant la période hivernale et une réponse maximale durant la période estivale ( Fig 1).

Il est donc impératif de restreindre au maximum la plage de prélèvements afin d'éviter des erreurs d'interprétation. Le planning de cette étude, détaillé dans le chapitre 3.1.2, a été programmé de Février à Avril.

### 2.1.2 Rythmes ultradiens

Les rythmes ultradiens présentent une période inférieure à vingt heures, ne correspondant pas de ce fait à un cycle environnemental connu. Si on peut alors douter de leur rôle adaptatif, ils sont en réalité essentiels sur le plan des régulations fonctionnelles. Les rythmes ultradiens endogènes tiennent une place primordiale dans les diverses stratégies d'adaptation aux variations apériodiques ou périodiques du milieu extérieur. Le plus anciennement connu est le pouls, mais, de nos jours, on note des variations périodiques ultradiennes au niveau encéphalique, cardiaque, digestif, ainsi que dans tout l'organisme.

### 2.1.3 Rythmes circadiens

Les rythmes circadiens sont en étroite relation avec le cycle astronomique caractérisant la rotation de la terre sur elle-même. Ce qui caractérise le plus ces rythmes, est ce que l'on appelle communément « le jour et la nuit », avec l'alternance de la présence et l'absence de lumière. Les périodes d'activité et de repos en sont les plus connues. Mais, il existe de nombreux autres critères qui répondent à ce cycle, comme la température ou des facteurs physiologiques (concentration en glucocorticoïdes). Ce rythme quotidien qui influe sur de nombreux facteurs physiologiques, et spécialement sur le statut immunitaire à médiation cellulaire constitue l'objectif de cette étude chez le chien.

## 2.2 Les rythmes circadiens [ 10, 11, 21, 25, 29, 33, 34, 35, 45, 48, 54, 67, 68, 69]

En considérant maintenant le rythme des facteurs liés au cycle journalier, la région hypothalamique apparaît comme l'élément fondamental de la gestion des variations nyctémérales. Si cette gestion peut apparaître comme une réponse à des stimuli environnementaux, elle possède aussi une composante endogène qui correspond à l'existence d'une horloge interne.

### 2.2.1 Endogénie des rythmes circadiens

L'observation d'une activité cyclique proche de vingt quatre heures, chez les unicellulaires comme chez les métazoaires, dans des conditions constantes, laisse entrevoir un rythme d'origine endogène. On introduit alors la notion d'horloge biologique, permettant à l'organisme d'estimer le temps en l'absence de repères. Diverses expériences de confinement ont montré que la période de ces rythmes n'était pas précisément celle de la rotation terrestre, mais s'en approchait. Halberg F. proposa de définir le rythme circadien comme ayant une période comprise entre vingt heures et vingt huit heures. Il existe une certaine flexibilité dans la durée de cette période. Il a été constaté que la période est toujours aux alentours de vingt quatre heures et en perpétuelle réajustement. On appelle « synchronisation » ou « entraînement », la modification de ce rythme biologique afin de s'adapter aux facteurs exogènes.

Le principal « entraîneur » est le temps d'exposition à la lumière. Si l'activité et le repos sont les phénomènes les plus évidents de la photopériode, il a été démontré l'existence d'autres variations au sein de l'organisme, comme notamment au niveau de la corticosurrénale.

D'autres travaux ont également démontré que, chez les métazoaires, il n'existe pas un « oscillateur » central qui dicte le réglage horaire de l'organisme, mais que l'on trouve une cohabitation entre plusieurs « oscillateurs », avec une notion de hiérarchie autour d'un « pacemaker principal ».

### 2.2.2 Principal « pacemaker » et transcription des données pour l'organisme

La recherche sur les principaux organisateurs temporels a conduit à une région précise de l'hypothalamus : les noyaux suprachiasmatiques. Ces derniers sont sans conteste l'horloge maîtresse des mammifères, mais certains auteurs mentionnent une origine plus complexe. Ainsi certains travaux ( MAUREL D. et al, 1990 ) mettent en avant l'existence d'un ou plusieurs « pacemakers secondaires », sans pour autant minimiser le rôle incontestable et essentiel de ce « pacemaker central ».

Cette étude n'a pas pour objectif de rapporter les données scientifiques concernant cette région hypothalamique, qui garde, du reste, de nombreux secrets. Il est simplement important de noter que l'on observe une activité électrique circadienne de ces noyaux, ainsi que l'existence de variations circadiennes de l'activité métabolique ou de la production de neuropeptides.

Le contrôle des cycles nycthémeraux de l'organisme, par cet oscillateur essentiel, ne peut s'expliquer sans parler de sa place privilégiée anatomiquement. L'existence des voies afférentes permet l'intégration des informations environnementales et les voies efférentes variées restituent les modifications à apporter à tout l'organisme. La liste elle même, des fonctions assujetties au cycle circadien ( reproduction, sommeil, comportement, température interne, homéostasie ...), montre la complexité liée au réseau des voies efférentes. La seule vraiment décryptée, de nos jours, est celle conduisant à la sécrétion de la mélatonine durant la nuit, par la glande piénale.

C'est pour cela, qu'une tentative d'explication de la variation du statut immunitaire à médiation cellulaire chez le chien serait prétentieuse, à la vue des facteurs et organes entrant en jeu dans ce processus. Il est plus sage de n'en faire qu'une constatation, pouvant, par la suite, être corrélée avec d'autres informations. Ainsi , les résultats de cette étude sur le cycle nycthémeral de l'immunité cellulaire pourra être superposée à ceux de la concentration sanguine en glucocorticoïdes déjà connus.

### **3 ETUDE EXPERIMENTALE**

#### **3.1 Mise en œuvre de l'expérience**

##### **3.1.1 La population étudiée**

La population étudiée se compose de douze chiens Beagle de laboratoire, divisée en trois lots de quatre individus pour des raisons de facilité dans le travail de laboratoire. En effet, le traitement simultané de douze prélèvements n'était pas envisageable. Ce sont des mâles âgés de deux ans, vivant à l'extérieur, et nourris avec une ration individuelle de ROYAL CANIN MAINTENANCE tous les matins entre huit et dix heure. Ils en reçoivent environ trois cents grammes par jour.

La composition de l'aliment est la suivante (en pourcentage de matière sèche) :

- ◆ Energie Métabolisable : 3700 kCal/kg
- ◆ Humidité : 11%
- ◆ Protéines Brutes : 25%
- ◆ Matières Grasses : 10%
- ◆ Cellulose Brute : 2%
- ◆ Matières Minérales : 7,5%
- ◆ Extractif Non Azoté : 45%

La population est la plus homogène possible, mis à part le fait qu'ils ne soient pas issus de la même lignée.

##### **3.1.2 Planning des prélèvements**

L'objectif étant d'étudier les variations du statut immunitaire à médiation cellulaire sur une période de vingt-quatre heures, des prélèvements ont été effectués toutes les deux heures sur les chiens. L'expérimentation s'est déroulée de fin février à début mai, saison durant laquelle la réactivité lymphocytaire est en augmentation pour atteindre son apogée en été ( voir cycle circannuel chapitre 2.1.1 ). Le cycle nycthéméral a été divisé en trois parties :

- ◆ Matinée : 8-10-12-14 heure
- ◆ Soirée : 16-18-20-22 heure
- ◆ Nuit : 0-2-4-6 heure

Cette division arbitraire est obligatoire pour deux raisons essentielles. D'une part, après les quatre prélèvements effectués, il est nécessaire de laisser aux chiens le temps de rétablir son volume sanguin, et éviter ainsi de fausser les données en travaillant sur un sang appauvri ou dont la nature est différente. Après une série de prélèvements les individus sont laissés, pour cela, une quinzaine de jours au repos. D'autre part, chaque période de quatre prises de sang équivaut à douze heures de travail en laboratoire. En effet, la préparation des aliquots des milieux de culture, la mise en place des chiens commencent deux heures avant la première ponction, et le traitement des derniers tubes s'achève deux heures après le prélèvement.



### 3.2 Réalisation du test de transformation lymphoblastique

[ 2, 3, 7, 15, 22, 30, 36, 37, 38, 43, 46, 52, 53, 57, 63, 65]

On prélève dix millilitres de sang sur héparinate de lithium ( huit ml minimum ), à la veine jugulaire avec une alternance gauche-droite, à l'aide de tubes sous vide, d'un porte aiguilles et d'aiguilles à usage unique. Les tubes sont laissés quinze minutes au repos après avoir été agités délicatement pour répartir l'anticoagulant. Les prélèvements sont immédiatement mis en analyse, car il est suspecté que la conservation qui va de paire avec la lyse cellulaire, permet le relargage de thymidine non radioactive et ainsi la diminution d'incorporation de celle tritiée. L'objectif est de mettre en culture trente microlitres de suspension cellulaire à une concentration de quatre millions de cellules par millilitre dans un milieu minimum, avec pour certains puits des mitogènes à concentration optimale ou suboptimale.

#### 3.2.1 Séparation des lymphocytes [ 6, 70]

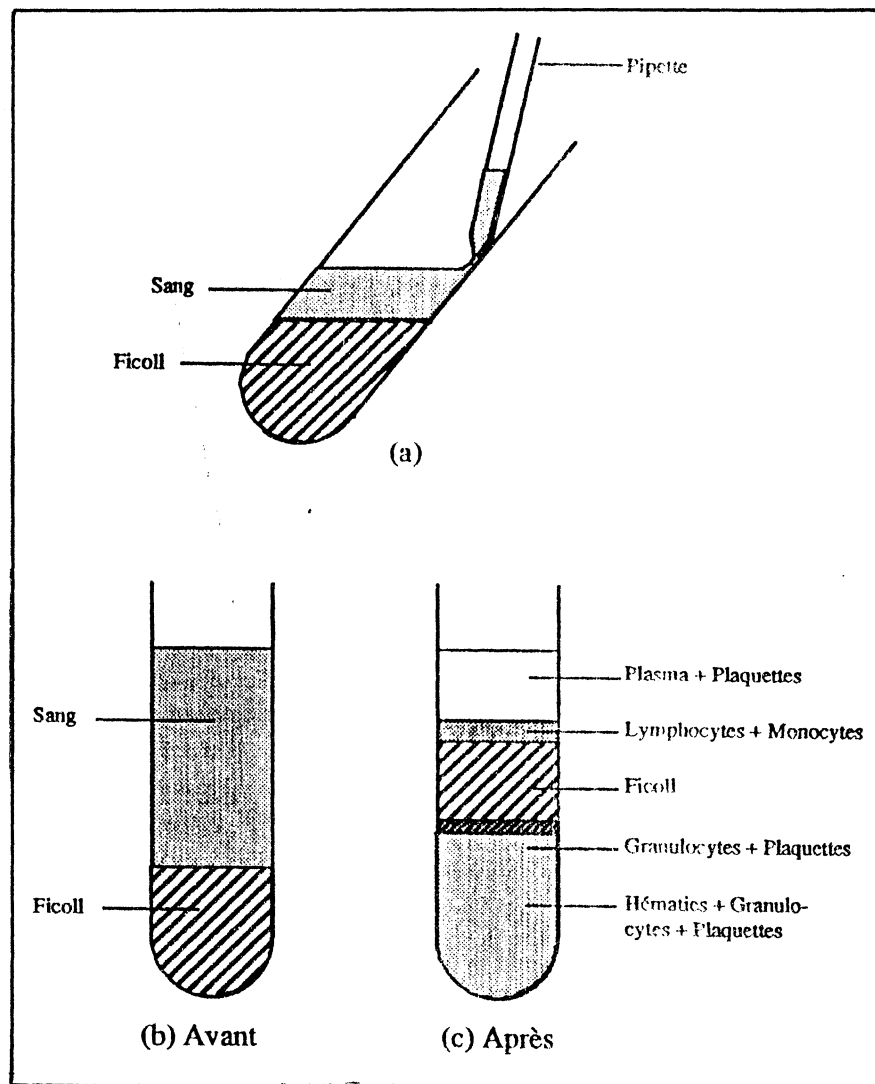
On dépose délicatement huit millilitres de sang sur quatre millilitres de Ficoll ( milieu de séparation des lymphocytes ) dans un tube de trente millilitres à fond rond, en prenant soin de ne pas mélanger les deux phases liquides ( Fig 2). Le tube est ensuite centrifugé durant trente minutes à huit cents g ( soit deux mille tours par minute ) à une température de quinze degrés Celcius. On obtient alors cinq phases dans le tube :

- le plasma et des plaquettes
- les lymphocytes et monocytes
- le Ficoll
- les granulocytes et des plaquettes
- les hématies, des granulocytes et des plaquettes

A l'aide d'une pipette Pasteur on ponctionne l'anneau blanc floconneux correspondant aux lymphocytes et aux monocytes, en prenant soin d'éviter le Ficoll cytotoxique, puis il est remis en suspension dans vingt cinq millilitres de liquide de Hanks, dans un tube à fond conique. Il est centrifugé dix minutes à cinq cents g ( mille huit cents tours par minute ), ce qui a pour effet de les coller dans le fond conique du tube. On vide la phase liquide et on remet le culot de cellules en suspension dans un millilitre de liquide de Hanks à l'aide d'une pipette. On ajoute alors une solution lysante que l'on laisse agir dix minutes à quatre degrés Celcius, afin d'obtenir un milieu contenant exclusivement des lymphocytes. On réajuste le volume du tube à vingt cinq millilitres ( avec vingt millilitres de Hanks ), puis on refait la centrifugation précédente. Ce lavage est réalisé trois fois. Le dernier culot ainsi purifié est mis en suspension dans un millilitre de RPMI.

#### 3.2.2 Ajustement de la concentration cellulaire

On additionne cent quatre vingts microlitres d'une solution colorante ( composée de cent quatre vingts microlitres d' eau bidistillée et de vingt microlitres de bleu Trypan ) à trente microlitres de la suspension cellulaire obtenue. On réalise un comptage sur une cellule de Malassez. On totalise le nombre de lymphocytes sur cinq carreaux pris en diagonale ( appelé N ), la concentration  $C = N * 140000$  cellules par millilitre, on ajuste alors cette dernière à quatre millions en ajoutant un volume  $V = ( C / 4000000 ) - 1$  millilitre de RPMI.



**Fig 2 :**

- (a) Dépôt du sang sur le Ficoll  
(b) centrifugation

### 3.2.3 Mise en culture des lymphocytes [ 39]

La suspension cellulaire ( donc à une concentration de quatre millions de cellules par millilitre ) est mise en culture dans les puits à fond rond de plaque à quatre vingt seize trous, à raison de cent microlitres par puits avec cent microlitres de RPMI pour les témoins ou cent microlitres d'une solution mitogénique ( ConA ou PHA ) à concentration optimale ou suboptimale. Chaque puits est reproduit en trois exemplaires. Pour une heure donnée, on a donc :

- 3 puits témoins avec du RPMI
- 3 puits avec une concentration suboptimale ( deux virgule cinq microgrammes par millilitre ) de concanavaline
- 3 puits avec une concentration optimale ( dix microgrammes par millilitre ) de concanavaline
- 3 puits avec une concentration suboptimale ( deux virgule cinq microgrammes par millilitre ) de phytohémagglutinine
- 3 puits avec une concentration optimale ( dix microgrammes par millilitre ) de phytohémagglutinine

Les milieux de culture avec les concentrations suboptimales ne rentrent pas en compte dans le calcul de l'indice de stimulation, mais permettent de vérifier la cohérence des résultats obtenus et d'éviter ainsi les aberrations. Leurs valeurs doivent raisonnablement se situer entre vingt cinq et soixante quinze pour cent de la valeur de la concentration optimale. Les plaques sont ensuite mises durant quarante huit heures en chambre humide à trente sept degrés Celcius et un taux de gaz carbonique de cinq pour cent. On incorpore alors zéro virgule cinq microcurie de thymidine tritiée sous un volume de vingt cinq microlitres ( soit vingt microcurie par millilitre ), puis on remet à l'étuve durant dix huit heures.

### 3.2.4 Filtrage et comptage [ 40]

La récupération des cellules est faite de manière manuelle, sur papier filtre à l'aide d'une pompe à vide. Après séchage, quarante cinq minutes à soixante degrés Celcius, les rondelles sont déposées dans les tubes de lecture contenant deux millilitres d'Instafluor ND. Les données sont transcrites par le compteur bêta sous forme de listing comprenant notamment :

- le numéro du tube
- le numéro du portoir
- le temps de lecture ( dix minutes par tube pour cette expérimentation )
- le nombre de coups par minute
- le nombre de dépression par minute ( DPM )

On calcule l'indice de stimulation ( IS ) à partir de la moyenne des trois DPM avec mitogène en concentration optimale divisée par la moyenne des trois DPM témoin. Ainsi lorsque l'IS est proche de un , les lymphocytes ne sont pas en phase de stimulation et ne répondent pas aux mitogènes. A l'inverse lorsque l'IS augmente , les lymphocytes sont en phase d'activation , se multiplient et incorporent la thymidine tritiée de manière importante sous l'effet des mitogènes. C'est la variation de l'intensité de cette réponse au cours des différentes heures du cycle nyctéméral qui va être analysée.

### 3.3 Résultats

#### 3.3.1 Données et étude graphique

Les données finales de cette étude dynamique sont relevées sous forme d'indice de stimulation au cours du nycthémère. Les résultats obtenus laissant entrevoir un pic réactionnel plus important pendant la nuit, cette période a été mise en valeur dans la restitution des résultats. Les données individuelles, ainsi qu'une moyenne des douze chiens, sont présentées de la figure 3 à 11. Les tableaux regroupant les DPM originaux sont répertoriés en annexe.

Avant de passer à l'étude statistique, nous pouvons dire que, dans l'ensemble, les résultats sont exploitables. Les différences entre les concentrations optimales et suboptimales sont dans la tranche de vingt cinq à soixante quinze pour cent.

Les courbes montrent une évolution comparable, même si elles ne sont pas superposables. On obtient une certaine cohérence entre les prélèvements effectués dans deux plages horaires différentes, notamment la nuit.

Enfin, les réponses obtenues vérifient l'hypothèse de départ, c'est à dire l'existence d'un cycle de type circadien pour cette fonction.

#### 3.3.2 Analyse statistique

La méthode statistique effectuée repose sur l'analyse des variances, avec l'aide du logiciel SYS-STAT. Le seuil de signification est fixé à cinq pour cent. Cette analyse reste individuelle car de trop grandes variations existent à un instant donné entre les chiens.

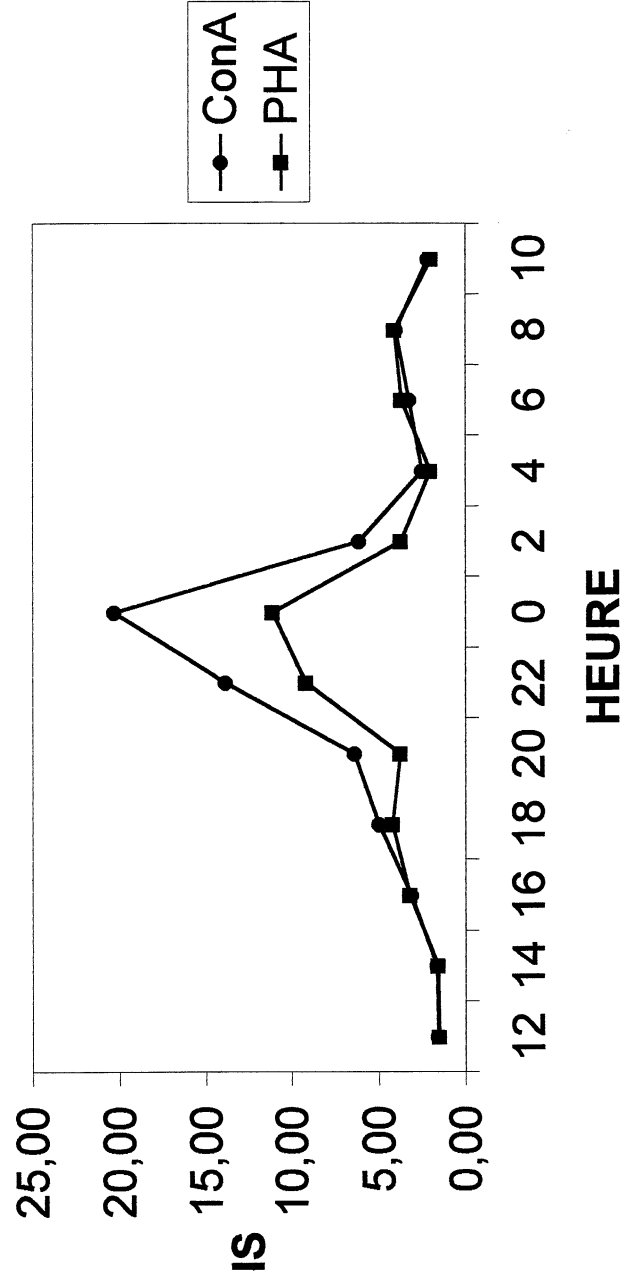
L'analyse montre des différences de stimulation entre les divers prélèvements des périodes de vingt deux heure et de minuit. Certains chiens font apparaître d'autres pics réactionnels sans pour autant que l'on puisse les généralisés. Mais les données diurnes révèlent une trop faible amplitude pour souligner de quelconques variations. Cette latence durant le jour et cette activité durant la nuit sont néanmoins significatives. On peut donc en déduire l'existence d'un rythme de type circadien, avec une activité maximale autour de minuit et minimale la journée.

En revanche, on ne peut préjuger de la réponse obtenue de tel ou tel individu à une heure fixée. Dans les expérimentations ultérieures, il faudra donc répéter les prélèvements à heure fixe et, si possible, que l'individu soit son propre témoin, car on note l'existence d'un effet individuel, surtout en ce qui concerne les résultats obtenus avec la phytohémagglutinine.

HEURE	12	14	16	18	20	22	0	2	4	6	8	10
ConA	1,60	1,67	3,17	5,00	6,43	13,89	20,32	6,16	2,51	3,26	4,06	2,17
PHA	1,52	1,60	3,24	4,23	3,78	9,21	11,11	3,75	2,04	3,7	4,12	2,02

**Fig 3:MOYENNE DES RESULTATS IS**

Concanavalline A et Phytohémagglutinine à  
concentration optimale



ConA	12	14	16	18	20	22	0	2	4	6	8	10
CHIEN 1	1,68	1,63	2,22	4,35	13,39	8,44	68,78	10,83	1,33	2,45	3,89	1,77
CHIEN 2	1,71	1,64	7,56	11,1	3,76	4,27	15,86	8,90	1,24	1,26	3,13	2,28
CHIEN 3	1,16	1,77	2,54	1,80	6,76	4,47	4,27	3,15	1,54	1,11	3,50	1,39
CHIEN 4	1,34	1,48	5,35	5,44	5,78	4,48	35,41	19,5	2,15	2,94	2,23	1,25
CHIEN 5	2,02	1,20	2,05	2,84	6,20	67,49	45,71	2,77	2,67	1,77	5,19	1,38
CHIEN 6	1,18	1,22	2,17	12,71	3,70	33,26	15,44	5,07	2,11	2,27	2,62	2,56
CHIEN 7	1,02	1,14	1,65	3,64	14,36	18,11	10,28	8,94	1,33	3,92	6,31	2,03
CHIEN 8	2,10	2,50	2,38	2,88	4,87	8,23	8,86	2,52	1,91	1,27	3,70	3,47
CHIEN 9	1,55	1,36	1,78	5,06	5,97	5,94	12,29	2,88	2,73	8,70	7,26	3,86
CHIEN 10	1,58	3,02	2,58	2,74	5,04	4,39	10,13	3,83	5,07	2,69	3,17	1,95
CHIEN 11	2,04	1,11	4,29	3,88	3,23	3,64	6,60	3,05	1,91	3,00	1,60	1,58
CHIEN 12	1,78	1,96	3,48	3,58	4,07	4,01	10,13	2,44	6,07	7,77	5,95	2,55

**Fig 4:**

**RESULTATS IS : ConA**

Concanavaline A à concentration optimale

PHA	12	14	16	18	20	22	0	2	4	6	8	10
CHIEN 1	1,53	1,64	1,65	3,59	4,31	2,74	24,58	2,26	2,61	2,40	3,10	1,76
CHIEN 2	1,77	1,73	2,36	6,77	2,13	1,95	7,98	3,58	1,92	2,19	3,21	1,74
CHIEN 3	1,27	1,07	2,22	1,47	3,57	1,88	1,95	1,96	1,19	1,06	2,65	1,72
CHIEN 4	1,37	1,46	5,35	4,34	2,11	4,76	29,79	13,30	1,31	2,65	1,84	1,13
CHIEN 5	1,99	1,67	1,98	2,43	2,60	32,30	21,90	1,65	1,79	3,77	6,92	1,35
CHIEN 6	1,18	1,62	2,83	7,20	3,70	32,09	8,09	2,05	1,99	12,26	8,03	2,43
CHIEN 7	1,15	1,13	2,63	2,03	4,47	10,12	2,13	3,44	1,45	4,09	5,53	2,21
CHIEN 8	1,84	2,09	1,78	1,90	1,53	3,48	5,60	5,24	1,71	2,06	2,94	3,39
CHIEN 9	1,22	2,84	3,80	6,76	6,38	4,75	6,49	2,76	1,64	3,38	6,38	3,75
CHIEN 10	1,72	1,68	3,68	7,03	6,29	6,76	8,97	3,55	1,90	1,88	3,35	1,75
CHIEN 11	1,84	1,04	5,36	3,8	4,45	4,58	6,04	2,96	1,49	1,88	1,38	1,55
CHIEN 12	1,40	1,26	5,19	3,38	3,78	5,12	9,81	2,20	5,43	6,79	4,06	1,48

**Fig 5:**  
**RESULTATS IS : PHA**  
 Phytohémagglutinine à concentration optimale

## CHIEN 1

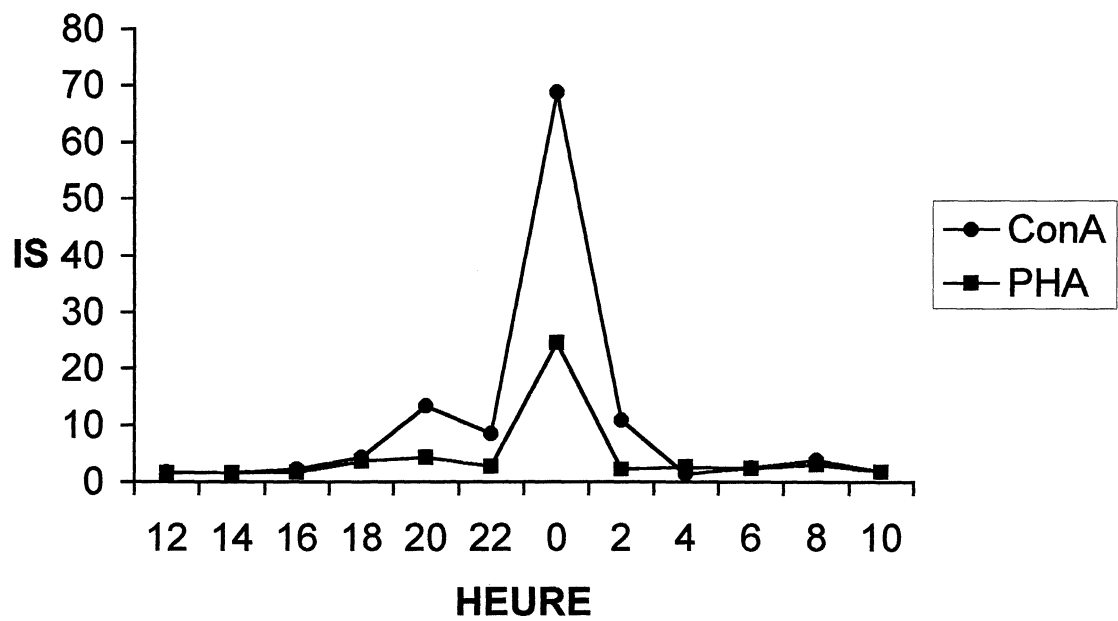
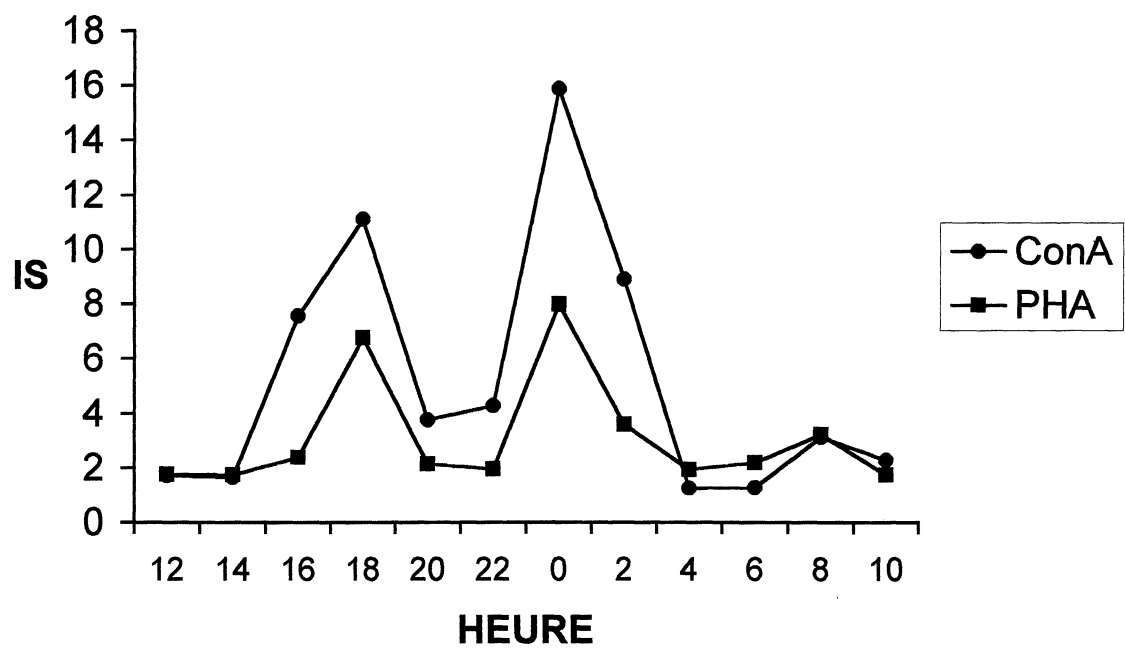


figure 6

## CHIEN 2





### CHIEN 3

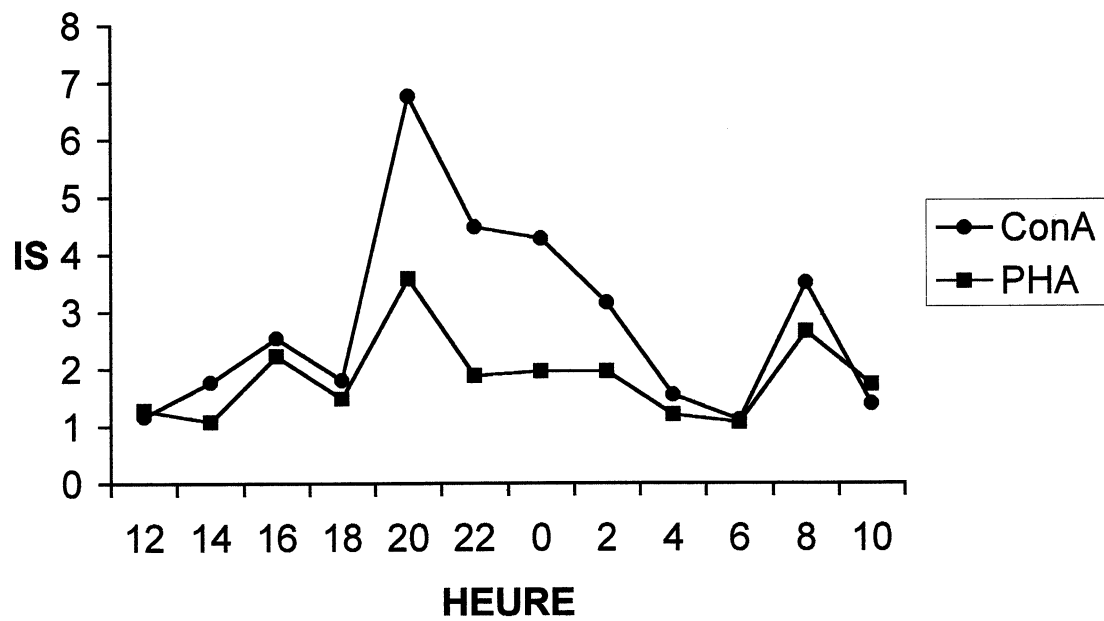
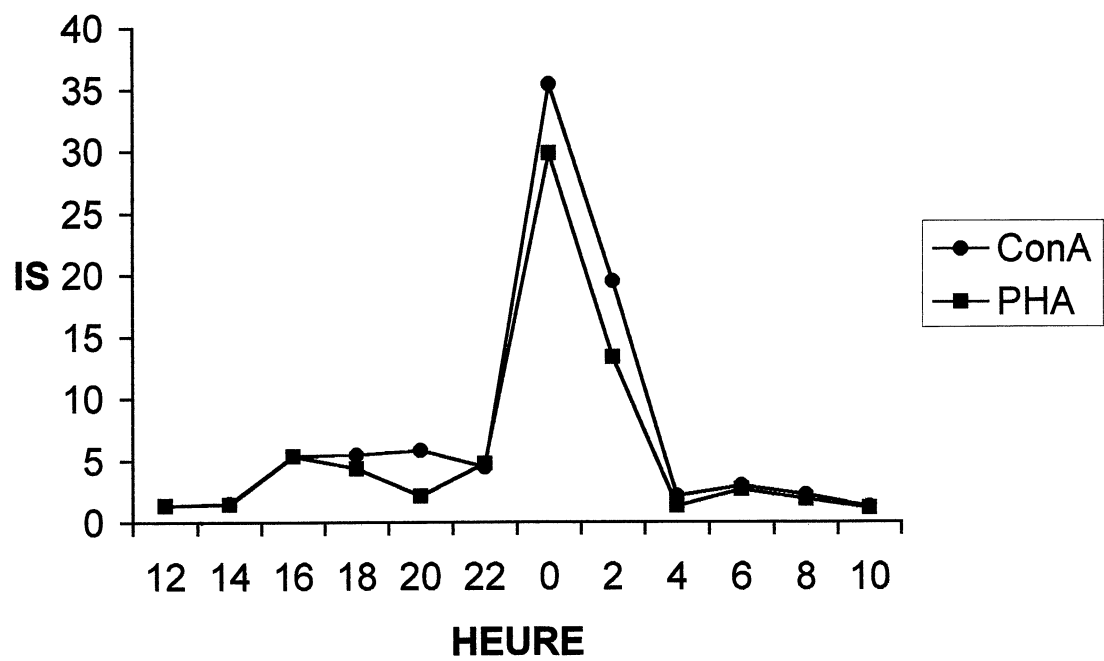
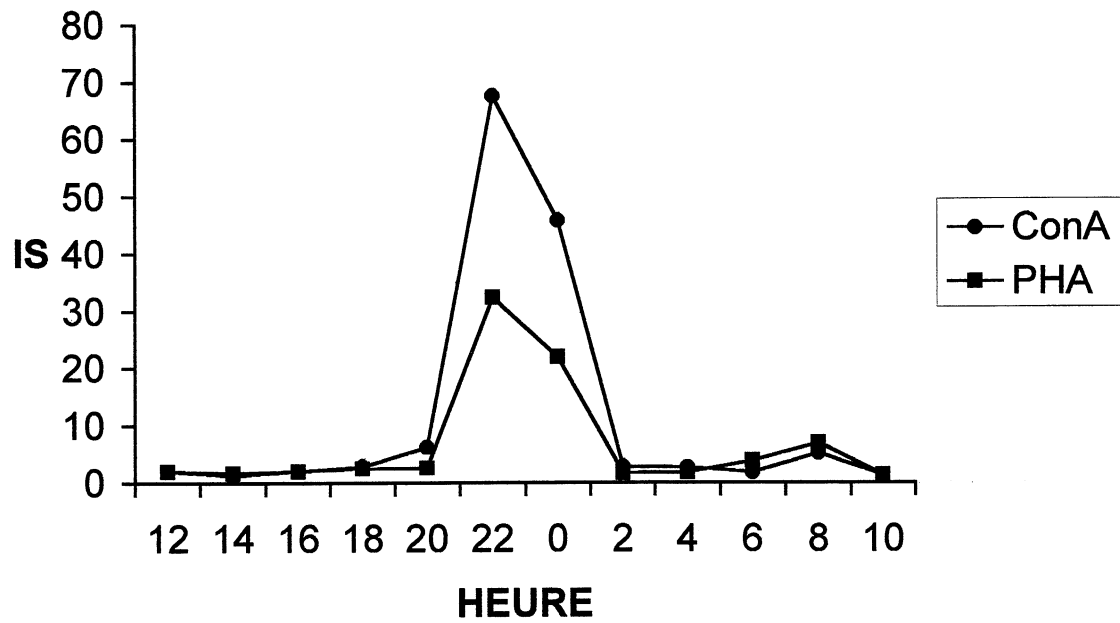


figure 7

### CHIEN 4

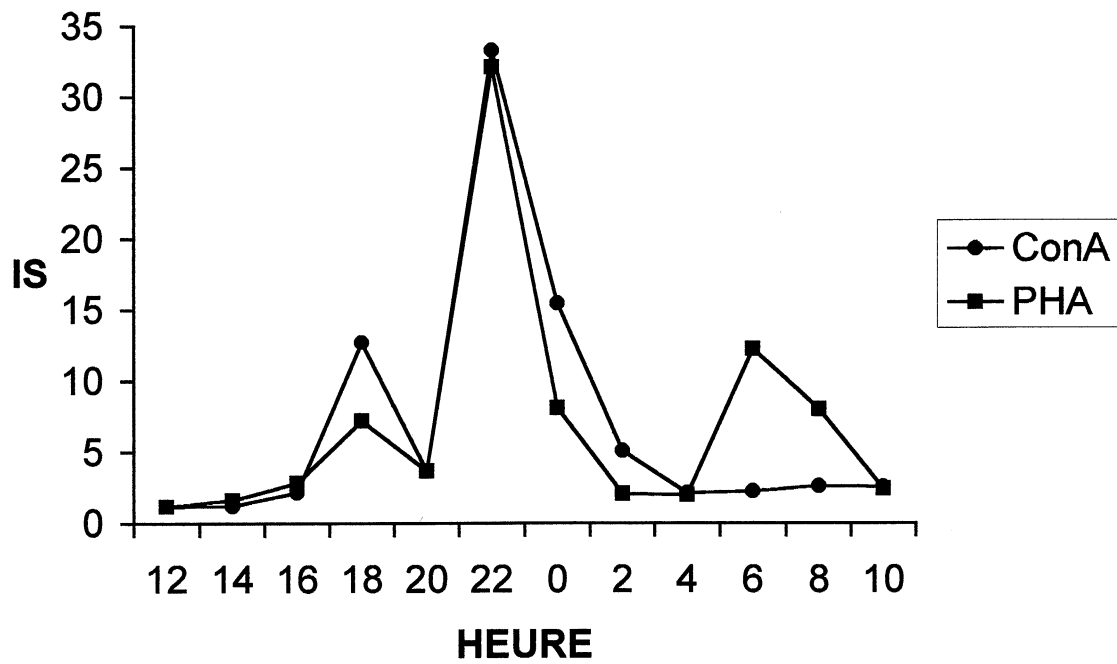


### CHIEN 5



**Figure 8**

### CHIEN 6



### CHIEN 7

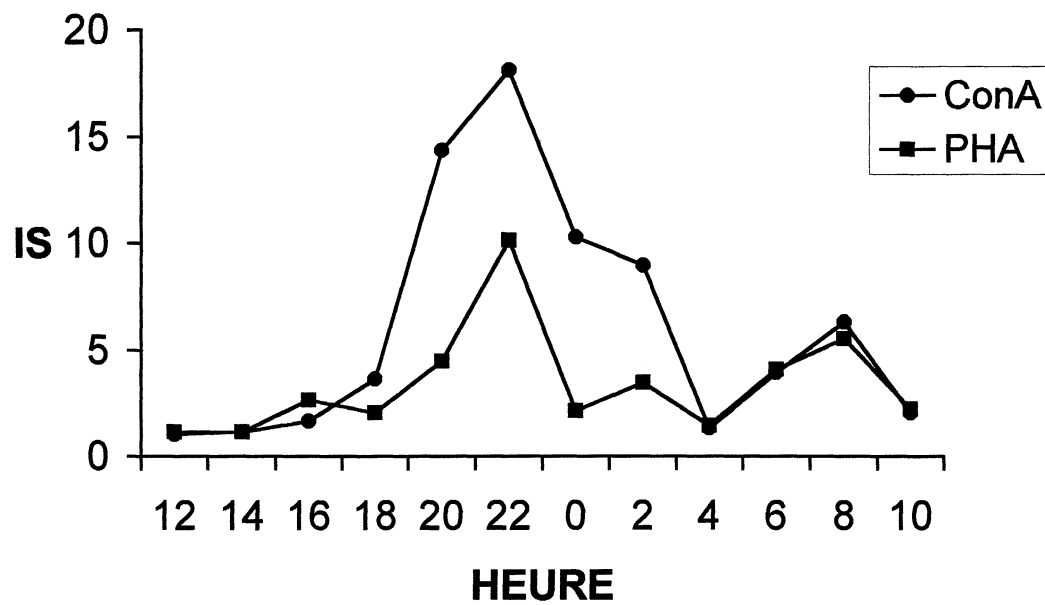
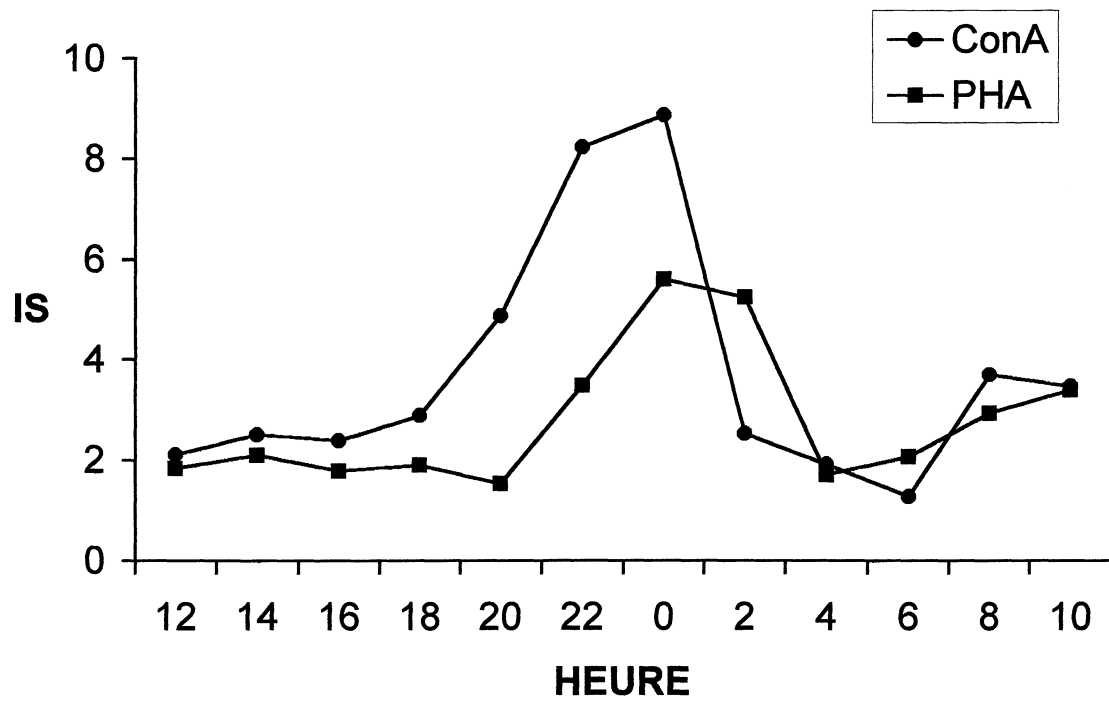


Figure 9

### CHIEN 8



### CHIEN 9

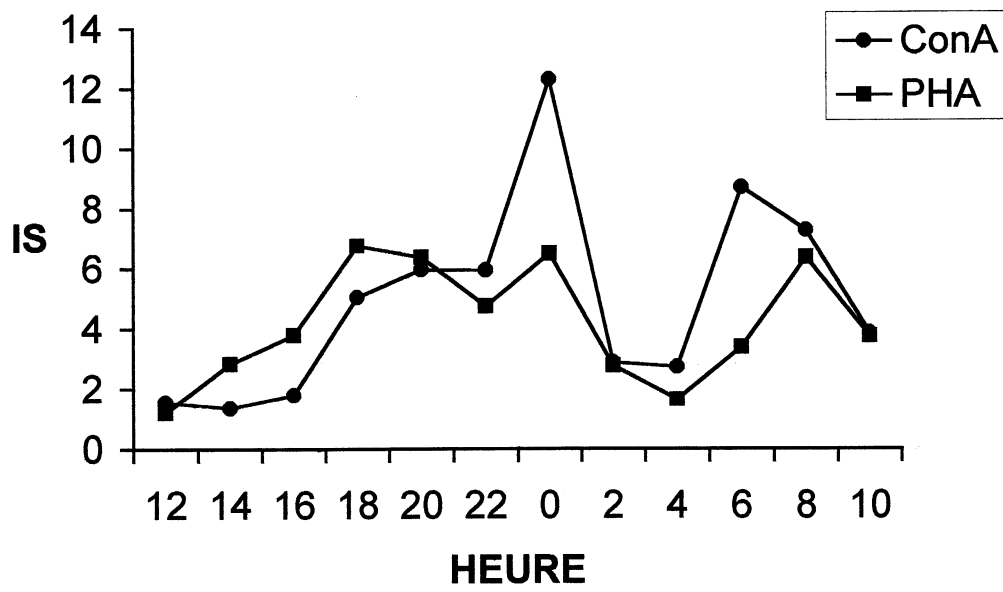
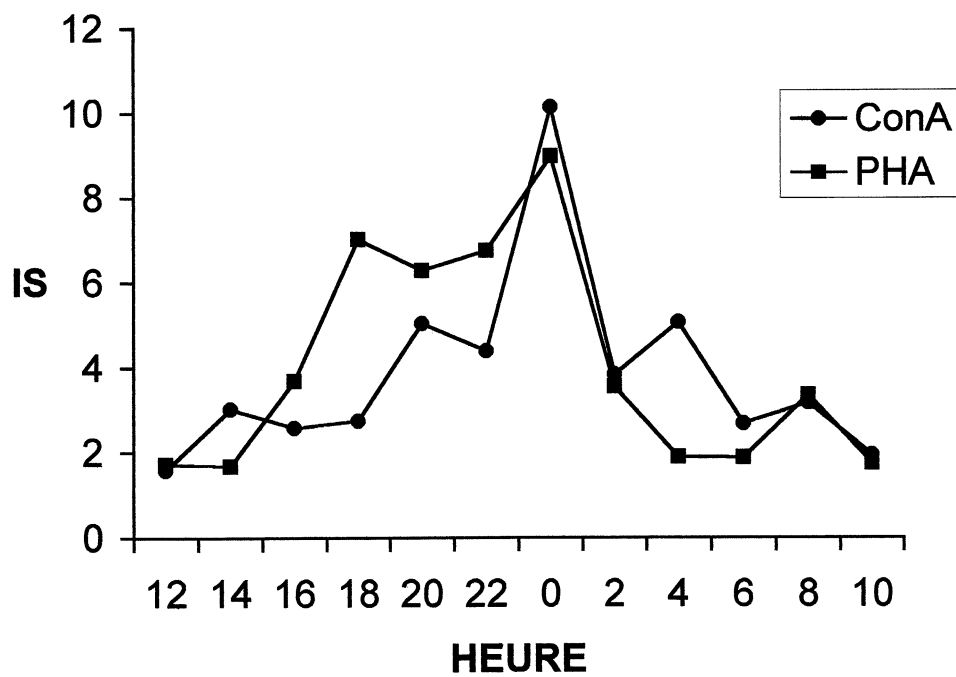


Figure 10

### CHIEN 10



## CHIEN 11

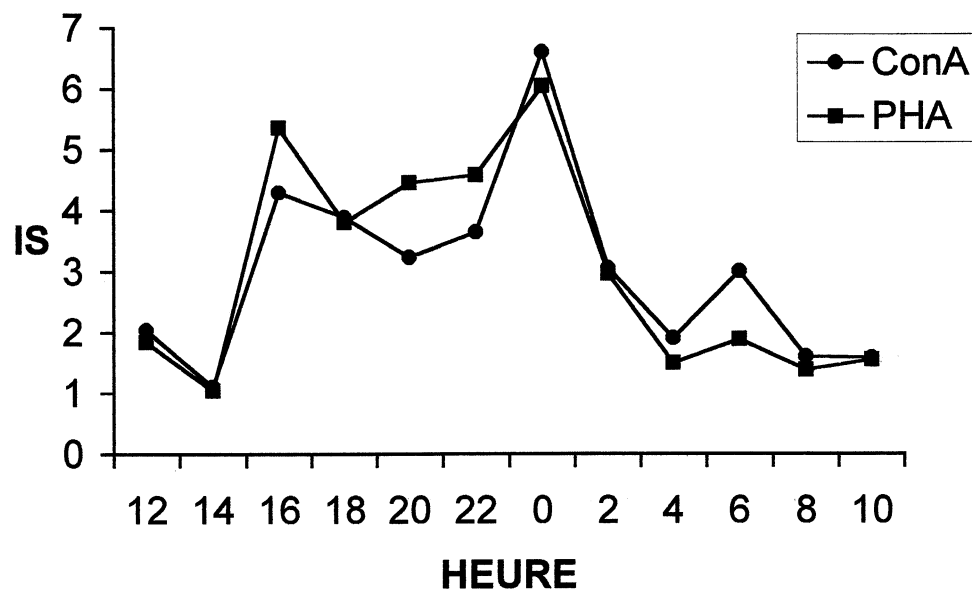
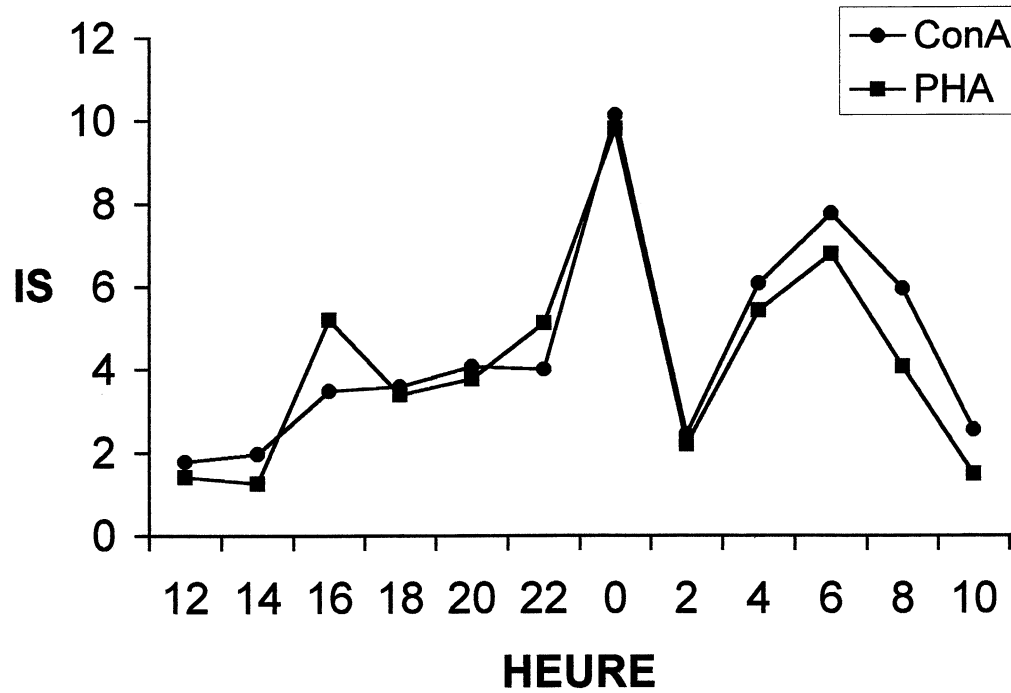


Figure 11

## CHIEN 12





## **4 DISCUSSION**

### **4.1 Choix de la population étudiée**

La population a été choisie pour être la plus représentative et la plus homogène possible, race, sexe, âge, entretien et conditions de vie. Il est notamment important que les chiens vivent à l'extérieur, pour laisser agir l'effet luminosité. Des individus de la même lignée auraient peut être donné des résultats avec des amplitudes de réponses plus proches.

### **4.2 Variations des réponses interindividuelles et intraindividuelles [18, 28, 44 ]**

On observe des variations dans l'intensité de la réponse au TTL entre les chiens, plus marquées avec la phytohémagglutinine, mais de manière globale, cela n'altère pas l'allure générale de la courbe obtenue. Peut être certains sont ils plus peureux que d'autres ? De plus, si on observe un certain décalage dans le temps, il est réduit. Le maximum n'est pas forcément entre zéro heure et zéro heure quinze minutes. Comme il a été souligné auparavant, chaque individu possède une structure temporelle propre et une horloge biologique en perpétuelle réajustement. Mais chacun étant son témoin sur l'ensemble du cycle nyctéméral, il possède une courbe personnelle qui se rapproche d'une moyenne générale.

Le facteur que nous n'avons pu minimiser est le stress. En effet, comme le souligne Kristensen et al [ 40], il est responsable de la baisse d'absorption de thymidine tritiée par les lymphocytes. Or, lors des manipulations diurnes, le stress est plus important dû à la vie de l'ENVT et le passage autour du département de microbiologie. En revanche, les chiens sont au calme et dans le noir durant les prélèvements nocturnes. Cela peut expliquer la faible stimulation obtenue durant la journée. On peut penser que le stress n'a pas faussé les résultats mais simplement exagéré la faible réactivité entre dix heure et seize heure.

### **4.3 Choix de la méthode d'exploration**

[ 2, 3, 7, 15, 22, 30, 36, 37, 38, 39, 43, 46, 47, 52, 53, 55, 57, 58, 62, 63, 65, 66 ]

Le test de transformation lymphoblastique avec l'utilisation de la Con A et de la PHA comme mitogènes, est le test in vitro le plus appréciable dans l'exploration de l'immunité à médiation cellulaire. Il présente l'avantage d'être simple à mettre en œuvre, même de manière répétitive comme dans cette étude.

En revanche, il présente l'inconvénient majeur d'avoir de nombreuses étapes de manipulation, considérées dès lors comme autant de source de variation, voire d'erreurs. Ces dernières ont pu être minimisées en standardisant au mieux les gestes nécessaires. Enfin, comme le précise Kristensen et al [ 39], les lymphocytes issus de sang périphérique répondent de manière plus anarchique que ceux issus des organes lymphoïdes. Mais, dans l'optique de cette expérimentation, les prélèvements ganglionnaires étaient irréalisables. Peut être a t on ici l'origine des variations observées dans les divers résultats ?

#### 4.4 Choix du planning de prélèvements

Comme il a été expliqué précédemment, le cycle de vingt quatre heures, a nécessité une division en trois périodes. Ce choix s'est avéré judicieux, car si l'on pouvait penser que la répétition des prises de sang aurait un effet sur la réponse au TTL, on observe qu'il n'en est rien. Durant la nuit l'IS baisse, est stable durant la journée et augmente dans la soirée. De plus, on retrouve une intensité assez semblable entre le quatrième prélèvement d'une période et le premier de la suivante. On peut donc penser que l'influence de la perte sanguine et du stress résultant de la répétition des ponctions a été minime.

#### 4.5 Objectifs et résultats de l'expérimentation [ 11, 28, 35, 44, 54]

Si cette expérimentation ne peut donner avec précision une courbe étalon applicable à toute l'espèce canine, elle établit néanmoins un profil de la réponse immunitaire à médiation cellulaire au cours du cycle nycthéral. Elle souligne que cette fonction répond à ce type de rythme et non à un rythme ultradien. Mais cette régulation horaire, ne doit pas occulter le fait qu'une agression extérieure ( comme une infection ) peut, à tout moment, modifier l'état immunitaire à un instant donné.

En ce qui concerne l'allure générale de la courbe, elle peut être corrélée avec des données existantes. La concentration sanguine en glucocorticoïdes est élevée le matin et basse le soir. Sachant qu'ils possèdent une action inhibitrice, cela corrobore les observations obtenues. Mais, étant donné la multitude des facteurs intervenant sur la fonction immunitaire, il serait réducteur d'expliquer cette courbe que par ce seul facteur. Il est plus sage de les corrélés, puis de les comparer à d'autres.

Cette étude démontre surtout la nécessité de fixer une plage horaire minimale pour la réalisation de prélèvements, afin que le facteur « heure de la journée » n'induisse pas d'erreurs dans l'interprétation des résultats. De manière globale, en relation avec les rythmes biologiques, on peut dire qu'il existe un cycle circadien ainsi qu'un cycle circannuel concernant le système immunitaire à médiation cellulaire dans l'espèce canine. Les expérimentations ultérieures, sur l'influence de tel ou tel facteur sur l'immunité, devront prendre en compte ces données et établir un planning en conséquence.



## **CONCLUSION**

La connaissance des rythmes biologiques et des variations des paramètres de l'organisme devient de plus en plus importante dans l'analyse des examens complémentaires ou dans l'expérimentation de laboratoire. La suppression de l'influence de ces facteurs « heure » ou « saison » permet une plus grande fiabilité des travaux entrepris et évite des conclusions erronées. Le planning et les horaires sont donc une donnée essentielle dans l'établissement et l'analyse de prélèvements.

D'autres éléments, comme l'immunité à médiation humorale dont nous n'avons pu analyser les prélèvements faute de place, peuvent aussi varier durant les divers cycles, confortant ainsi les interactions observées entre les paramètres biologiques et les grandes fonctions de l'organisme.

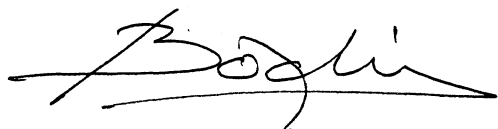
**AGREMENT ADMINISTRATIF**

Je soussigné, M. BONNES, Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que  
**M. CARLIER Philippe**  
a été admis(e) sur concours en : 1989  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 16 septembre 1998  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

Je soussigné, Professeur BODIN de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, déclare que j'ai lu la thèse de :  
**M. CARLIER Philippe**  
intitulée :  
*Influence du cycle nycthémeral sur le statut immunitaire à médiation cellulaire du chien Beagle de laboratoire.*  
et que je prends la responsabilité de l'impression.

**Le Professeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



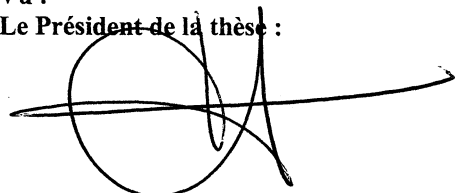
**Professeur G. BODIN**

**Vu :  
Le Directeur par intérim  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



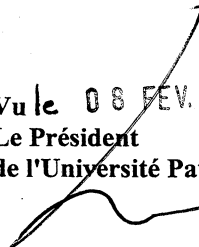
**Monsieur G. BONNES**

**Vu :  
Le Président de la thèse :**

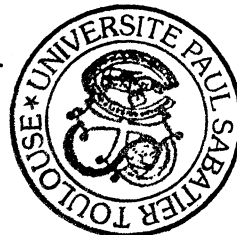


**Professeur H. DABERNAT**

**Vu le 08 FEV. 2001  
Le Président  
de l'Université Paul Sabatier**



**Professeur R. BASTIDE**



**ANNEXE**

## **Matériel utilisé**

- Vacutainer
- Aiguilles à prélèvement 0,9 X 35
- Tubes sous vide sur héparinate de lithium , type Vénoject de 10 ml
- Tubes à centrifuger à fond rond de 15 ml
- Tubes à centrifuger à fond conique de 30 ml
- Centrifugeuse
- Pipeteur manuel
- Pipeteur électrique
- Pipettes en verre de 1 , 2 , 5 et 10 ml
- Pipettes automatiques réglables de 50 µl , 200 µl et de 1 ml , avec les embouts adaptés
- Cellule de Malassez
- Plaques à microtitration de 96 cupules à fond plat , munies d'un couvercle
- Système de récupération cellulaire dans les cupules ( NUNC cell harvester 8 )
- Filtres en fibre de verre de 25 X 75 mm ( NUNC )
- Flacons de comptage de 5 ml avec bouchon ( POLYLABO )
- Compteur bêta

## **Réactifs utilisés**

- Ficoll-hypaque de densité 1,077 ( EUROBIO )
- Solution de Hanks ( BIOMERIEUX ) : solution saline tamponnée assurant la survie cellulaire , utilisée comme solution de rinçage
- Solution hémolysante préparée au laboratoire (  $\text{NH}_4\text{Cl}$  à 0,155 mol/l ,  $\text{KHCO}_3$  à 0,01 mol/l , EDTA à 0,01 mol/l )
- Solution Bleu Trypan préparée au laboratoire à 2% dans l'eau bidistillée
- RPMI 1640 ( BIOMERIEUX ) : milieu de culture des cellules , enrichi avec 10% de sérum de veau ( EUROBIO ), 0,03% de glutamine , 5% de gentamycine et 0,25% d'amphotéricine B
- Mitogènes , présentés sous forme de poudre : flacon de 5mg pour la PHA et de 25 mg pour la ConA ( SIGMA ). Ils sont conditionnés en aliquots à 500 µg /ml , congelés puis utilisés à la demande
- Thymidine tritiée à 1 mCi / ml ( AMERSHAM )
- Liquide scintillateur Instafluor ( PACKARD )

CHIENS	CULTURE	12	14	16	18	20	22	0	2	4	6	8	10
Chien 1	Temoin	160.66	162.93	192.95	170.47	209.67	253.47	352.75	488.51	802.96	988.88	142.56	144.19
	ConA Sub	185.56	187.61	240.77	315.95	529.67	570.25	13281.80	1029.89	809.67	1139.16	234.24	152.08
	ConA Opt	249.35	265.20	427.64	741.24	2807.52	2140.42	24261.33	5289.13	1065.03	2423.63	554.99	254.63
	PHA Sub	164.37	163.35	181.56	269.61	419.42	333.73	5358.53	653.15	1615.85	1422.99	247.17	143.36
	PHA Opt	245.79	267.55	318.80	612.26	904.40	695.12	8670.33	1103.41	2115.49	2372.43	442.20	253.26
Chien 2	Temoin	157.00	189.12	240.73	82.16	193.56	205.94	375.60	312.21	337.89	242.26	138.96	151.14
	ConA Sub	178.30	208.23	322.90	486.51	381.21	285.03	4573.85	966.21	516.08	227.23	249.85	187.28
	ConA Opt	268.10	310.38	1819.79	911.87	727.79	879.46	5957.92	2778.92	418.93	306.02	435.37	345.97
	PHA Sub	180.01	222.38	375.79	294.43	22.29	220.14	738.24	444.41	527.49	391.19	246.31	166.99
	PHA Opt	278.26	327.08	567.11	555.94	412.28	402.39	2997.24	1118.36	650.27	531.31	445.83	262.45
Chien 3	Temoin	105.56	136.57	249.55	226.09	213.47	338.11	306.49	352.98	359.30	213.62	101.23	113.06
	ConA Sub	92.63	158.52	486.13	269.95	672.48	652.55	427.35	399.90	478.12	237.73	113.95	114.32
	ConA Opt	122.37	241.56	633.86	406.26	1442.99	1511.35	1309.87	1111.55	551.79	320.46	354.13	157.61
	PHA Sub	108.46	123.76	288.12	226.11	421.09	357.46	498.55	442.08	399.06	225.67	19.47	98.33
	PHA Opt	134.38	145.58	553.19	332.45	761.62	636.13	596.80	692.46	428.47	329.10	268.29	194.54
Chien 4	Temoin	136.49	166.37	332.44	212.35	241.21	157.43	391.06	345.05	383.45	212.55	108.63	153.01
	ConA Sub	148.23	135.50	648.14	660.36	401.04	346.90	6209.31	2139.36	473.81	225.44	121.14	174.45
	ConA Opt	182.63	246.05	1778.56	1154.59	1393.28	704.58	13847.13	6726.89	825.61	625.44	241.78	151.26
	PHA Sub	174.15	138.125	947.01	492.50	388.60	287.82	4178.80	753.88	613.41	230.01	137.11	116.31
	PHA Opt	186.71	243.37	1777.95	921.50	509.93	750.12	11651.27	4590.75	502.65	563.77	199.64	173.55

**Résultats DPM**  
**Chiens 1 à 4**

CHIENS	CULTURE	12	14	16	18	20	22	0	2	4	6	8	10
Chien 5	Temoin	291.06	491.30	179.07	162.33	135.50	487.62	431.34	406.80	358.20	361.16	323.36	507.32
	ConA Sub	504.30	500.93	268.07	250.78	252.34	17691.53	14978.87	494.23	634.28	411.40	499.78	542.36
	ConA Opt	589.14	587.46	367.22	460.63	844.11	32911.43	19719.72	1124.82	956.14	637.83	1677.02	700.60
	PHA Sub	461.16	409.61	252.49	254.59	184.23	8984.27	5711.97	674.87	648.20	798.20	1178.80	497.89
	PHA Opt	578.64	821.48	354.19	394.95	348.90	15747.03	9445.68	670.06	640.25	1361.13	2237.53	686.34
Chien 6	Temoin	583.14	414.61	178.96	62.86	131.65	155.53	421.53	348.39	400.98	214.64	314.66	385.25
	ConA Sub	509.96	463.71	257.97	163.64	160.23	1791.19	5042.28	827.41	450.11	382.66	282.04	419.73
	ConA Opt	688.0	505.88	387.81	799.22	489.51	5172.33	6509.01	1767.86	846.15	487.34	824.70	987.46
	PHA Sub	554.78	634.14	264.95	244.56	208.75	2366.18	305.03	478.83	784.13	433.69	1352.24	846.15
	PHA Opt	689.03	671.29	363.94	453.56	494.62	4991.04	3408.90	714.24	796.10	2631.58	2526.11	937.70
Chien 7	Temoin	693.14	527.64	71.85	193.09	104.27	120.40	611.32	415.15	461.25	240.73	352.56	361.08
	ConA Sub	588.64	548.72	84.48	234.97	362.52	1140.28	1198.80	1043.50	498.73	562.16	719.03	408.19
	ConA Opt	703.59	601.90	118.36	702.34	1497.54	2180.62	6285.95	3711.42	612.48	943.05	2223.11	734.16
	PHA Sub	731.15	541.63	80.65	348.20	361.95	7139.71	760.67	930.09	504.23	404.42	733.68	661.02
	PHA Opt	799.93	594.70	188.62	392.31	466.05	1218.28	1303.70	1428.98	529.02	984.59	1949.65	799.33
Chien 8	Temoin	482.19	349.93	152.75	167.77	162.62	179.98	362.24	369.54	256.78	199.16	464.56	200.85
	ConA Sub	861.47	578.02	276.28	282.07	349.03	1001.28	1109.58	41.87	490.23	266.19	541.57	530.48
	ConA Opt	1013.84	873.24	363.31	483.87	791.95	1482.51	3211.09	931.64	584.18	252.91	1721.19	697.13
	PHA Sub	745.49	691.55	254.51	272.66	106.50	285.69	865.75	687.28	437.87	294.76	706.13	549.17
	PHA Opt	887.16	730.48	272.22	318.65	248.56	225.59	2028.54	1936.47	604.26	410.27	1365.81	681.25

**Résultats DPM**  
**Chiens 5 à 8**

CHIENS	CULTURE	12	14	16	18	20	22	0	2	4	6	8	10
Chien 9	Temoin	279.22	339.41	368.07	329.13	425.86	622.81	691.72	495.96	377.36	384.25	245.59	155.74
	ConA Sub	368.89	304.63	436.37	70.14	970.54	1765.94	2930.76	826.27	458.20	923.29	1080.52	345.10
	ConA Opt	433.09	461.48	656.84	1666.58	2543.67	3697.77	8501.24	1428.08	1029.15	3341.47	1782.98	600.40
	PHA Sub	355.34	520.57	803.03	1169.32	1616.09	1571.93	1551.66	723.73	645.86	844.73	1001.45	429.54
	PHA Opt	342.04	964.10	1399.48	2226.28	717.00	2958.32	4488.99	1367.41	618.97	1299.50	1567.93	584.33
Chien 10	Temoin	222.57	238.58	324.77	221.94	313.67	283.36	343.00	236.34	340.81	313.67	210.84	344.39
	ConA Sub	246.23	517.12	389.58	443.23	623.08	623.14	1505.77	522.03	816.41	409.30	361.91	396.58
	ConA Opt	350.66	719.38	839.17	607.31	1579.99	1244.10	3474.59	905.33	1729.34	843.24	669.40	673.02
	PHA Sub	314.28	384.63	487.15	865.71	886.00	634.05	1461.18	384.88	420.20	467.86	351.56	458.21
	PHA Opt	381.91	401.73	1195.15	1560.23	1973.08	1915.31	3076.71	838.39	647.49	589.44	706.22	603.41
Chien 11	Temoin	342.77	357.83	354.57	244.70	307.75	355.29	375.02	211.76	357.49	379.45	458.24	263.91
	ConA Sub	587.85	351.65	1521.10	593.10	572.32	819.24	786.47	326.59	364.17	441.80	494.11	323.07
	ConA Opt	700.68	397.55	2230.35	949.29	993.84	1294.60	2475.13	646.50	680.80	1138.55	734.79	416.03
	PHA Sub	471.51	293.97	737.35	1115.75	630.17	692.69	1068.80	329.90	408.02	465.81	430.37	312.90
	PHA Opt	630.47	371.36	1900.49	929.86	1368.65	1629.90	2265.12	627.29	532.11	715.22	630.33	407.86
Chien 12	Temoin	285.78	200.82	485.42	211.75	263.63	258.71	392.15	210.56	333.13	362.61	212.41	213.30
	ConA Sub	380.53	223.12	548.46	287.45	669.76	526.31	1945.06	229.71	1029.50	1345.28	901.05	399.06
	ConA Opt	509.61	393.07	1689.60	759.12	1073.40	1036.67	3972.48	513.24	2020.74	2817.48	1264.19	544.57
	PHA Sub	339.15	186.85	1135.88	359.98	577.35	677.82	1784.28	231.04	632.71	1535.23	275.14	158.76
	PHA Opt	399.59	253.30	2519.32	715.71	996.52	1324.59	3846.99	464.13	1809.57	2462.12	861.74	314.86

**Résultats DPM**  
**Chiens 9 à 12**

CHIENS	CULTURE	12	14	16	18	20	22	0	2	4	6	8	10
Chien 1	ConA Sub	1.15	1.15	1.25	1.85	2.53	2.25	37.65	2.11	1.01	1.15	2.34	1.05
	ConA Opt	1.68	1.63	2.22	4.35	13.39	8.44	68.78	10.83	1.33	2.45	3.89	1.77
	PHA Sub	1.02	1.00	0.94	1.58	2.00	1.32	15.19	1.34	2.01	1.44	1.73	0.99
	PHA Opt	1.53	1.64	1.65	3.59	4.31	2.74	24.58	2.26	2.61	2.40	3.10	1.76
Chien 2	ConA Sub	1.14	1.10	1.34	5.92	1.97	1.38	12.18	3.09	1.53	0.94	1.80	1.24
	ConA Opt	1.71	1.64	7.56	11.10	3.76	4.27	15.86	8.90	1.24	1.26	3.13	2.28
	PHA Sub	1.15	1.18	1.56	3.58	1.15	1.07	1.97	1.42	1.56	1.61	1.77	1.10
	PHA Opt	1.77	1.73	2.36	6.77	2.13	1.95	7.98	3.58	1.92	2.19	3.21	1.74
Chien 3	ConA Sub	0.88	1.16	1.95	1.19	3.15	1.93	1.39	1.13	1.33	1.50	1.13	1.01
	ConA Opt	1.16	1.77	2.54	1.80	6.76	4.47	4.27	3.15	1.54	1.11	3.50	1.39
	PHA Sub	1.03	0.91	1.15	1.00	1.97	1.06	1.63	1.25	1.11	1.54	1.18	0.87
	PHA Opt	1.27	1.07	2.22	1.47	3.57	1.88	1.95	1.96	1.19	1.06	2.65	1.72
Chien 4	ConA Sub	1.09	0.81	1.95	3.11	1.66	2.20	15.88	6.20	1.24	1.06	1.12	1.14
	ConA Opt	1.34	1.48	5.35	5.44	5.78	4.48	35.41	19.50	2.15	2.94	2.23	1.25
	PHA Sub	1.28	0.83	2.85	2.32	1.61	1.83	10.69	2.18	1.60	1.08	1.26	0.76
	PHA Opt	1.37	1.46	5.35	4.34	2.11	4.76	29.79	13.30	1.31	2.65	1.84	1.13

**Résultats IS**  
**Chiens 1 à 4**



CHIENS	CULTURE	12	14	16	18	20	22	0	2	4	6	8	10
Chien 5	ConA Sub	1.73	1.02	1.50	1.54	1.86	36.30	34.73	1.21	1.77	1.14	1.55	1.07
	ConA Opt	2.02	1.20	2.05	2.84	6.20	67.49	45.71	2.77	2.67	1.77	5.19	1.38
	PHA Sub	1.58	0.83	1.41	1.57	1.30	18.42	13.24	1.66	1.81	2.21	3.65	0.98
	PHA Opt	1.99	1.67	1.98	2.43	2.60	32.30	21.90	1.65	1.79	3.77	6.92	1.35
Chien 6	ConA Sub	0.87	1.12	1.44	2.60	1.20	11.52	11.96	2.37	1.12	1.78	0.90	1.09
	ConA Opt	1.18	1.22	2.17	12.71	3.70	33.26	15.44	5.07	2.11	2.27	2.62	2.56
	PHA Sub	0.95	1.53	1.42	3.89	1.60	15.21	2.15	1.37	1.96	2.02	4.30	2.20
	PHA Opt	1.18	1.62	2.83	7.20	3.70	32.09	8.09	2.05	1.99	12.26	8.03	2.43
Chien 7	ConA Sub	0.85	1.04	1.18	1.22	3.48	9.47	1.96	2.51	1.08	2.34	2.04	1.13
	ConA Opt	1.02	1.14	1.65	3.64	14.36	18.11	10.28	8.94	1.33	3.92	6.31	2.03
	PHA Sub	1.05	1.03	1.12	1.80	3.47	6.14	1.24	2.24	1.09	1.68	2.08	1.83
	PHA Opt	1.15	1.13	2.63	2.03	4.47	10.12	2.13	3.44	1.45	4.09	5.53	2.21
Chien 8	ConA Sub	1.79	1.65	1.81	1.68	2.15	5.56	3.06	1.14	2.30	1.34	1.17	2.64
	ConA Opt	2.10	2.50	2.38	2.88	4.87	8.23	8.86	2.52	1.91	1.27	3.70	3.47
	PHA Sub	1.55	1.98	1.67	1.63	0.65	1.58	2.39	1.86	2.48	1.48	1.52	2.73
	PHA Opt	1.84	2.09	1.78	1.90	1.53	3.48	5.60	5.24	1.71	2.06	2.94	3.39

**Resultats IS**  
**Chiens 5 à 8**

CHIENS	CULTURE	12	14	16	18	20	22	0	2	4	6	8	10
Chien 9	ConA Sub	1.32	0.90	1.19	2.13	2.28	2.83	4.23	1.66	1.21	2.40	4.39	2.22
	ConA Opt	1.55	1.36	1.78	5.06	5.97	5.94	12.29	2.88	2.73	8.70	7.26	3.86
	PHA Sub	1.27	1.53	2.18	3.55	3.79	2.52	2.24	1.46	1.71	2.20	4.07	2.76
	PHA Opt	1.22	2.84	3.80	6.76	6.38	4.75	6.49	2.76	1.64	3.38	6.38	3.75
Chien 10	ConA Sub	1.11	2.17	1.20	2.00	1.99	2.20	4.39	2.21	2.40	1.30	1.72	1.15
	ConA Opt	1.58	3.02	2.58	2.74	5.04	4.39	10.13	3.83	5.07	2.69	3.17	1.95
	PHA Sub	1.41	1.61	1.50	3.90	2.82	2.23	4.26	1.63	1.23	1.49	1.67	1.33
	PHA Opt	1.72	1.68	3.68	7.03	6.29	6.76	8.97	3.55	1.90	1.88	3.35	1.75
Chien 11	ConA Sub	1.71	0.98	2.01	2.42	1.86	2.31	2.10	1.54	1.02	1.16	1.08	1.22
	ConA Opt	2.04	1.11	4.29	3.88	3.23	3.64	6.60	3.05	1.91	3.00	1.60	1.58
	PHA Sub	1.38	0.82	2.08	4.56	2.05	1.95	2.85	1.56	1.14	1.23	0.94	1.19
	PHA Opt	1.84	1.04	5.36	3.80	4.45	4.58	6.04	2.96	1.49	1.88	1.38	1.55
Chien 12	ConA Sub	1.33	1.11	1.13	1.36	2.54	2.03	4.96	1.09	3.09	3.71	4.24	1.87
	ConA Opt	1.78	1.96	3.48	3.58	4.07	4.01	10.13	2.44	6.07	7.77	5.95	2.55
	PHA Sub	1.19	0.93	2.34	1.70	2.19	2.62	4.55	1.10	1.90	4.23	1.30	0.74
	PHA Opt	1.40	1.26	5.19	3.38	3.78	5.12	9.81	2.20	5.43	6.79	4.06	1.48

**Résultats IS**  
**Chiens 9 à 12**

## **BIBLIOGRAPHIE**

- 1- ADER R. , COHEN N. , FELTEN D. : Psycho-neuro-immunology : interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet* , 1995 , 345(8942) , 99-103.
- 2- ARCHIMBAULT D. , MORIN G. , ELAZHARY M.A.S.Y. : Le test de transformation lymphoblastique en médecine vétérinaire. *Méd. Vét. Québec* , 1987 , 17(4) , 161-166.
- 3- BACH J.F. : L'exploration de l'immunité chez l'homme. In : BACH J.F. : Immunologie. Médecine Sciences Flammarion , Paris , 3<sup>ème</sup> ed. , 1986 , 1014-1024.
- 4- BACH J.F. : Cellules lymphoïdes. In : Immunologie animale , PASTORET P.P. , GOVAERTS A. et BAZIN H. ( Eds) , Médecine Sciences Flammarion , Paris , 1990 , 35-40.
- 5- BACH J.F. : Réponse cellulaire. In : Immunologie animale , PASTORET P.P. , GOVAERTS A. et BAZIN H. ( Eds) , Médecine Sciences Flammarion , Paris , 1990 , 143-148.
- 6- BARTA O. , SHAFER L.M. et HUANG L.J. : Separation of lymphocytes , monocytes and neutrophils. In : Laboratory Techniques of Veterinary Clinical Immunology , BARTA O. (Eds) , CHARLES C. THOMAS , Springfield , 1984 , 31-42.
- 7- BARTA O. , SHAFER L.M. et OYEKAN P.P. : Lymphocyte transformation (activation) test. In : Laboratory Techniques of Veterinary Clinical Immunology , BARTA O. (Eds) , CHARLES C. THOMAS , Springfield , 1984 , 86-100.
- 8- BETTON G.R. , DEKKERS-BIJMA A.M. et LANSDORP P.M. : Mitogenic responses of canine peripheral blood lymphocytes to staphylococcal protein A. *J. Immun. Methods* , 1980 , 32 , 157-166.
- 9- BOYD R.L. , TUCEK C.L. , GODFREY D.I. , IZON D.J. , WILSON T.J. , DAVIDSON N.J. , BEAN A.G.D. , LADYMAN H.M. , RITTER M.A. et HUGO P. : The thymic microenvironment. *Immunology today* , 1993 , 14(9) , 445-455.
- 10- BRITTAIN R.W. , WEINER N.I. : Neural and pavlovian influences on immunity. *Av.J.Biol.Sci.* , 1985 , 20(4) , 181-94.
- 11- CANGUILHEM B. , BOISSIN J. : Les rythmes du vivant. Nathan /CNRS Ed. ,Paris , 1990 , 31-159.
- 12- CASTOLDI F. , POZZA O. : Immunodeficiency evaluation in the dog and cat. *European J. of Companion Animal Practice* , 1991 , 2(1) , 56-67.

- 13- CHARLEY B. , CONTENT J. et PASTORET P.P. : Cytokines. In : Immunologie animale , PASTORET P.P. , GOVAERTS A. et BAZIN H. ( Eds) , Médecine Sciences Flammarion , Paris , 1990 , 149-162.
- 14- CLOS J. , LEGRAND C. : Hormones , facteurs de croissance et développement du système nerveux des mammifères. In : Hormones et grandes fonctions , Coordonnateur DUPOUY J.P. , Tome 1 , Editions Ellipses , 1992 , 211-296.
- 15- COCKERELL G.L. , HOOWER E.A. , LUBUGLIO A.F. et TOHN D.S. :  
Phyto mitogen- and antigen-induced. blast Transformation of feline lymphocytes. Am J. Vet. Res. , 1975 , 36 , 1489-1494.
- 16- CORBEL C. : Ontogénèse du système immunitaire. In : Immunologie animale , PASTORET P.P. , GOVAERTS A. et BAZIN H. ( Eds) , Médecine Sciences Flammarion , Paris , 1990 , 187-191.
- 17- COUTURE C. , POTWOROWSKI E. : Le thymus : un réseau complexe de signalisation intercellulaire. M/S , 1992 , 8 , 572-6.
- 18- DANZER R. , NEVEU P.J. et KELLEY K.W. : Stress et réponse immune. In : Immunologie animale , PASTORET P.P. , GOVAERTS A. et BAZIN H. ( Eds) , Médecine Sciences Flammarion , Paris , 1990 , 397-405.
- 19- DARDENNE M. , KELLY P.A. , BACH J.F. et SAVINO W. : Identification and functional activity of prolactin receptors in thymic epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 1991 , 88 , 9700-4.
- 20- DESCHAUX P. : Hormones et immunité. In : Hormones et grandes fonctions , Coordonnateur DUPOUY J.P. , Tome 1 , Editions Ellipses , 1992 , 297-340.
- 21- ESKOLA J. , MOLNAR G. et SOPPI E. : Biological rythm of cell mediated immunity in man. Clin. Exp. Immunol. , 1976 , 26 , 253-257.
- 22- FAN P.T. , YU D.T.Y. , CLEMENTS P.J. , OPETZ G. , GODBERG L. et BLUESTONE R. : Daily variation in circulating lymphocyte counts , T and B proportions and responsiveness to phytohaemagglutinin. Life Science , 1977 , 21 , 793-802.
- 23- FELTEN D. et Coll. : Sympathic innervation of mirine thymus and spleen : evidence for a functional link between the nervous and immune systems. Brain Res. Bull. , 1981 , 6 , 82-9.
- 24- FELTEN D. et Coll. : Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. J. Imm. , 1985 , 135(2) , 755-65.

- 25- FELTEN D. et Coll. : Experimental basis for neural-immune inter-actions. *Physiol. Rev.* , 1995 , 75(1) , 77-106.
- 26- FOURNEL C. et PERSON J.M. : Fonctions des lymphocytes chez les carnivores. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.* , 1986 , 21(1) , 9-16.
- 27- FOURNEL C. , MENETRIER C. , RIGAL D. et CHABANNE L. : Identification des sous-poultions leucocytaires du chien : revue bibliographique. *Revue Méd. Vét.* , 1989 , 140(7) , 579-587.
- 28- GACHELIN G. : Emotions et immunité. *La Recherche* , 1986 , 177(numéro spécial) , 662-6.
- 29- GEENEN V. , LEGROS J.J. et FRANCHIMONT P. : Interactions neuro-endocrino-immunitaires. In : *Immunologie animale* , PASTORET P.P. , GOVAERTS A. et BAZIN H. ( Eds ) , Médecine Sciences Flammarion , Paris , 1990 , 123-129.
- 30- GERY I. , GERSHON R.K. et WAKSMAN B.H. : Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. Parts I and II. *J. Exp. Med.* , 1972 , 136(1) , 128-155.
- 31- GRECO D.S. et HARPOLD L.M. : Immunity and the endocrine system. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* , 1994 , 24(4) , 765-82.
- 32- GROSSMAN C.J. : Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrine Reviews* , 1984 , 5(3) , 435-455.
- 33- HOREAU J. : Psycho-neuro-immunologie. In : *Hypnose clinique. Collection abrégés* , Editions Mason , 1992 , 160-9.
- 34- JOHNSON H.M. , SMITH E.M. , TORRES B.A. et BLALOCK J.E. : Regulation of the in vitro antibody response by neuro-endocrine hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. , USA* , 1982 , 79 , 4171-4180.
- 35- KAPLAN M.S. , BYERS V.S. , LEVIN A.S. , GERMAN D.F. et FUDENBERG H.H. : Circadian rythm of stimulated lymphocyte blastogenesis. A 24 hour cycle in the mixed leukocyte culture reaction and with S.K.S.D. stimulation. *Allergy Clin. Immunol.* , 1976 , 58 , 180-189.
- 36- KEJINDU G.O.C. , SHIFRINE M. et MISHRA H.P. : Chemiluminescence of canine peripheral blood lymphocytes stimulated by mitogens. *Vet Immunol. Immunopathol.* , 1986 , 11 , 175-192.
- 37- KRAKOWKA S. et RINGLER S.S. : Activation specificity of commonly employed mitogens for canine B and T lymphocytes. *Vet Immunol. Immunopathol.* , 1986 , 11 , 281-289.

- 38- KRISTENSEN F. , KRISTENSEN B. et LAZARY S. : The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. *Vet Immunol. Immunopathol.* , 1982 , 3 , 203-277.
- 39- KRISTENSEN F. , KRISTENSEN B. , VANDEVELDE M. , HIGGINS R.J. et DE WECK A.L. : Canine lymphocyte culture in vitro : evaluation of peripheral blood lymphocyte response to mitogens. *Vet Immunol. Immunopathol.* , 1982 , 3 , 439-448.
- 40- KRISTENSEN F. , KRISTENSEN B. , VANDEVELDE M. , WALKER C. et DE WECK A.L. : Technical aspects of low H3-thymidine incorporation by mitogen stimulated canine peripheral blood lymphocytes in vitro. *Vet Immunol. Immunopathol.* , 1982 , 3 , 557-566.
- 41- LEMETAYER J. : Contribution à l'étude des interrelations fonctionnelles entre cytokines dans l'activation lymphocytaire T. Thèse Doct. Vét. , Nantes , 1989.
- 42- MADDEN K.S. , SANDERS V.M. , FELTEN D.L. : Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* , 1995 , 35 , 417-48.
- 43- MEDDLEAU L. , CRODWE D.T. et DAWE D.L. : Effect of surgery on the in vitro response of canine peripheral blood lymphocytes to phytohemagglutinin. *Am. J. Vet. Res.* , 1983 , 44(5) , 859-860.
- 44- MORMEDE P. : Les réponses neuroendocriniennes de stress. *Rec. Méd. Vét.* , 1988 , 164(10) , 723-41.
- 45- MORMEDE P. et DANZER R. : La réponse non spécifique de l'organisme aux agressions : du stress à la psychobiologie de l'adaptation. *Rec. Méd. Vét.* , 1988 , 164(10) , 707-13.
- 46- NAKANISHI A. , AIMI K. , EJIMA H. et KUOKAMA K. : Measurement of blastogenesis of canine peripheral blood lymphocytes against PHA by glucose consumption test. *J. Vet.* , Japon , 1986 , 48 , 53-60.
- 47- OFFREDI P. : Quelques tests de mise en évidence de l'activité des immunostimulants. Thèse Méd. Vét. , Alfort , 1987 , 49.
- 48- PANERAI A.E. : Problems and perspectives in the approach to neuro-endocrine immuno-modulation studies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* , 1994 , 741 , 81-4.
- 49- PASTORET P.P. , GOVAERTS A. et BAZIN H. : Immunologie animale. Editions Médecine Sciences Flammarion , Paris , 1990 , 740p.
- 50- PELLERIN J.L. : Le système immunitaire : de la physiologie à la pathologie. In : Premières journées nantaises d'immunopathologie animale. 1990 , 5-17.

- 51- PERSON J.M. : Le système immunitaire du chien. *Rec. Méd. Vét.* , 1978 , 154(6) , 507-522.
- 52- RAI-EL-BALHAA G. , PELLERIN J.L. , BODIN G. , ABDULLAH A. :  
Lacompétence immunitaire du jeune veau peut elle être un critère d'appréciation du devenir zootechnique. ( Note préliminaire : mise au point d'un test de transformation lymphoblastique). *Rev. Méd. Vét.* , 1985 , 136(7) , 531-540.
- 53- RAI-EL-BALHAA G. , PELLERIN J.L. , BODIN G. , ABDULLAH A. :  
Lymphoblastic transformation assay of sheep peripheral blood lymphocytes : a new rapid and easy to read technique. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* , 1985 , 8(3/4) , 311-318.
- 54- RAI-EL-BALHAA G. , PELLERIN J.L. , BODIN G. , ABDULLAH A. : Importance of the hour of sampling in the lymphoblastic transformation assay of sheep peripheral blood lymphocytes. *Vét. Immunol. Immunopathol.* , 1987 , 16 , 67-76.
- 55- RAI-EL-BALHAA G. , PELLERIN J.L. , BODIN G. , ABDULLAH A. : Blastogenic response of peripheral blood lymphocytes from multiparous pregnant ewes. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* , 1987 , 14 , 110-114.
- 56- ROITT I. : Immunologie. 3<sup>ème</sup> Edition , 1994.
- 57- SHAAF-LAFONTAINE N. : Transformation lymphoblastique. In : Immunologie animale , PASTORET P.P. , GOVAERTS A. et BAZIN H. ( Eds) , Médecine Sciences Flammarion , Paris , 1990 , 643-644.
- 58- SHELTON G.D. , FUJI Y. et LINDSTROM J. : mitogen stimulation of canine normal and myasthenia gravis lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* , 1990 , 24 , 1-9.
- 59- SHIFRINE M. , TAYLOR N.J. , ROSENBLATT L.S. et WILSON F.D. : Comparison of whole blood and purified canine lymphocytes in a lymphocyte stimulation microassay. *Am. J. Vet. Res.* , 1978 , 39 , 687-690.
- 60- SHIFRINE M. , TAYLOR N.J. , ROSENBLATT L.S. et WILSON F.D. : Seasonal variation in cell-mediated immunity of clinically normal dogs. *Int. Soc. Exp. Hematol.* , 1980 , 8 , 318-326.
- 61- STEIN M. , SCHIAVI R.C. et CAMERINO M. : Influence of brain and behavior on the immune system. *Science* , 1976 , 191 , 435-444.
- 62- TAJIMA M. , FUJINAGA T. , OKAMOTO Y. , OTOMO K. et KOIKE T. :  
Relationship between mitogen receptors in peripheral blood lymphocytes and blastogenic responses to mitogen. *Res. Vet. Sci.* , 1990 , 48(1) , 1-5



- 63- TAJIMA M. , FUJINAGA T. , OTOMO K et MIZUMO S. : The distributions of phytohemagglutinin-P and concanavalin A binding sites on equine , bovine and canine peripheral blood lymphocytes. J. Vet. Med. B. , 1990 , 37(4) , 290-296.
- 64- TANIGUCHI A. , ISHIDA T. , KONNO A. , WASHIZU T. et TOMODA I. : Altered mitogen response of peripheral blood lymphocytes in different stages of feline immunodeficiency virus infection. JAPON , J. Vet. Sci. , 1990 , 52 , 513-518.
- 65- THILSTED J.P. et SHIFRINE M. : Lymphocyte transformation in the dog : response of lymphocyte from normal and immune dogs to phytohemagglutinin , coccidioidin , and purified protein derivative. Am. J. Vet. Res. , 1977 , 38 , 81-87.
- 66- THILSTED J.P. , SHIFRINE M. et WIGER N. : Correlation of in vitro and in vivo test for cell mediated immunity in the dog. Am. J. Vet. Res. , 1979 , 40(9) , 1313-1315.
- 67- WEIGENT D.A. et BLALOCK J.E. : Interactions between the immune and neuroendocrine systems : commun hormones and receptors. Immunol. Rev. , 1987 , 100 , 79-96.
- 68- WICK G. , HU Y. , SCHWARZ et KROEMER G. : Immunoendocrine communication via the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in autoimmune diseases. Endocrine Reviews , 1993 , 14(5) , 539-563.
- 69- WILLIAMS J.M. , PETERSON R.G. , SHEA P.A. , SCHMEDTJE J.F. , BAUER D.C. et FELTEN D.L. : Sympathic innervation of murine thymus and spleen : evidence for a functional link between the nervous and immune systems. Brain Research Bulletin , 1981 , 6(1) , 83-94.
- 70- WUNDERLI P.S. et FELSBURG P.J. : An improved method for the isolation of enriched canine peripheral blood mononuclear cell and peripheral blood lymphocyte preparations . Vet. Immunol. Immunopathol. , 1989 , 20 , 335-344.
- 71- YUHKI N. et O'BRIEN S.J. : Mollecular characterization and chromosomal assignement of the major histocompatibility complex class I and II genes in domestic cat. In : WARNER C.M. et Coll. The mollecular biology of the major histocompatibility complex of domestic animal species. Iowa , State University Press / Ames , 1988 , Abstract n°11.







Toulouse, 2001

NOM : CARLIER

PRENOM : Philippe

TITRE : Influence du cycle nycthémeral sur le statut immunitaire à médiation cellulaire du chien Beagle de laboratoire

RESUME :

Le statut immunitaire à médiation cellulaire du chien est analysé sur une période de vingt-quatre heures dans la perspective d'établir ses variations au cours du cycle nycthémeral.

Après quelques rappels sur le système immunitaire et les rythmes biologiques, l'auteur décrit l'expérimentation. Elle consiste à effectuer des prélèvements sanguins toutes les deux heures, durant une période de vingt quatre heures, et à mesurer les variations des réponses au test de transformation lymphoblastique des lymphocytes du sang périphérique de douze individus.

Les résultats mettent en évidence l'existence d'un rythme circadien, avec une différence d'activité entre les périodes diurne et nocturne. Néanmoins, pour des raisons exposées et discutées dans cette contribution, ils ne permettent pas d'établir un étalonnage général. Des éléments de corroboration, avec des données existantes, et de réflexion, pour la réalisation de recherches ultérieures, sont alors avancés.

MOTS-CLES : Immunité à médiation cellulaire, rythme biologique, cycle nycthémeral, rythme circadien, test de transformation lymphoblastique

---

ENGLISH TITLE : Nycthemeral cycle influence on a cellular mediation dependant immunological state in a laboratory Beagle dog

ABSTRACT :

A cellular mediation dependant immunological state in a dog was analysed during twenty four hours in order to study its variations along the nycthemeral cycle.

Following a review on the immunitary system and on the biological rhythms, experimentation was described. Hematological samples were collected every two hours in a twenty four hours period. Lymphoblastic transformation of peripheral blood lymphocytes were tested on twelve dogs.

A circadian rhythm associated with various activities between diurnal and nocturnal periods was observed. Nevertheless, for some reasons described and discusses in this thesis, standardization was not possible. For further research, stranghtening elements with existing data and different hypotheses were discussed.

KEY WORDS : Mediation cellular immunity, biological rhythm, nycthemeral cycle, circadia, rhythm, lymphoblastic transformation test

